

**Zur Primärstruktur der  $\alpha 2$ -Kette aus  
Kalbshautkollagen. Isolierung und  
Charakterisierung der chymotryptischen  
Peptide von  $\alpha 2$ -CB 3,5.**

**Evangelos Hadjiargyriou Moschoudis**

**1974**







Zur Primärstruktur der  $\alpha 2$ -Kette aus Kalbs-  
hautkollagen. Isolierung und Charakterisie-  
rung der chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München



vorgelegt von  
Evangelos Hadjiargyriou Moschoudis

München 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
  2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
- Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.1974

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Kühn durchgeführt.

Herrn Prof. K. Kühn danke ich für das stetige Interesse und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. P.P. Fietzek möchte ich herzlich für die Betreuung der Arbeit und anregende Diskussionen danken, ferner allen Mitarbeitern, die durch technische Hilfe oder Ratschläge am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, insbesondere Frau Dr. M. Stark und Herrn Dr. F.W. Rexrodt.



Es ist nicht mehr  
diese  
zuweilen mit dir  
in die Stunde gesenkte  
Schwere. Es ist  
eine andere.

Es ist das Gewicht, das die Leere zurückhält,  
die mit -  
ginge mit dir.  
Es hat, wie du, keinen Namen. Vielleicht  
seid ihr dasselbe. Vielleicht  
nennst auch du mich einst  
so.

(Celan)



# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

|        |                                                                                                                                   |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | EINLEITUNG                                                                                                                        | 1  |
| 1.1.   | Aufgabestellung                                                                                                                   | 7  |
| 1.2.   | Zur Nomenklatur der chymotryptischen Peptide von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub>                                                    | 8  |
| 1.3.   | Abkürzungen                                                                                                                       | 9  |
| 2.     | ERGEBNISSE                                                                                                                        | 10 |
| 2.1.   | Isolierung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> aus der $\alpha 2$ -Kette von Kalbshautkollagen                                      | 10 |
| 2.2.   | Isolierung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> aus säurelöslichem Kalbshautkollagen (SLK)                                           | 12 |
| 2.3.   | Spaltung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin                                                                       | 14 |
| 2.3.1. | 10 Minuten Spaltung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin                                                            | 17 |
| 2.4.   | Kurzzeitspaltung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin                                                               | 25 |
| 2.4.1. | Spaltung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin bei verschiedenen Zeiten                                              | 25 |
| 2.4.2. | 2 Minuten Spaltung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin                                                             | 26 |
| 2.5.   | Nachspaltung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> -C <sub>3</sub> und $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> -C <sub>4</sub> mit Chymotrypsin | 30 |
| 2.5.1. | 8 Minuten Spaltung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> -C <sub>3</sub> mit Chymotrypsin                                             | 30 |
| 2.5.2. | 8 Minuten Spaltung von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin                                                             | 32 |
| 2.6.   | Lokalisierung der zwei Tyrosinreste von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub>                                                             | 33 |

|                                                                                       | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.7. Zuordnung der chymotryptischen Peptide<br>von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub>      | 38    |
| 3. HOMOLOGIE ZWISCHEN DER $\alpha 1$ - UND $\alpha 2$ -KETTE VON<br>KALBSHAUTKOLLAGEN | 43    |
| 4. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG                                                     | 46    |
| 5. EXPERIMENTELLER TEIL                                                               | 49    |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS                                                               | 57    |

## 1. EINLEITUNG

Das Skleroprotein Kollagen ist der Hauptbestandteil des Bindegewebes, der Sehnen, Knorpel, Knochen und Zähne. Sein Molekül ist aus drei Polypeptidketten mit je 1052 Aminosäuren aufgebaut. Das Kollagen vom Typ I, das in Vertebraten am häufigsten vorkommt, wird aus zwei identischen  $\alpha 1$ - und einer genetisch differenten  $\alpha 2$ -Kette gebildet(1). Die drei Ketten sind um eine gemeinsame Achse zu einer Rechtsschraube, der sogenannten Tripelhelix, verdreht. Sie ist durch Wasserstoffbrücken verfestigt (2,3) und bedingt die stabförmige Gestalt des Moleküls. Voraussetzung für die Ausbildung der Tripelhelix ist der hohe Iminosäuregehalt und das Auftreten von Glycin in jeder dritten Position. An den N- und C-terminalen Bereichen jeder Kette befinden sich kurze Sequenzabschnitte, die wegen eines geringeren Gehalts an Glycin keine tripelhelikale Struktur einnehmen können (4,5). Sie sind etwa 15-20 Aminosäuren lang und können durch Proteasen abgespalten werden, ohne daß die Tripelhelix zerstört wird. Durch Erwärmen auf 37° bricht die Helix zusammen und das Molekül zerfällt in die Einzelketten. Beim Abkühlen bildet sich jedoch die tripelhelikale Struktur teilweise wieder zurück.

Die Biosynthese des Kollagens beschäftigt in jüngster Zeit viele Arbeitsgruppen. Es wurde dabei festgestellt, daß die Polypeptidkette in einer Vorläuferstufe, dem Prokollagen, synthetisiert wird (6,7,8). Nach elektronen-

mikroskopischen Untersuchungen sind die Peptidketten des Prokollagens, das vor kurzem auch isoliert wurde, am N-Terminus um etwa 200 Aminosäuren länger. Die Struktur und Aminosäurezusammensetzung dieser "additional peptides" weichen wesentlich von dem helikalen Teil des Kollagens ab (9,10). Das Kollagenmolekül kann sich in seiner "Precursor"-Form nicht zu Fibrillen zusammenlagern. Erst nachdem im extrazellulären Raum diese zusätzlichen Peptide durch spezifische Proteasen abgespalten werden, erhalten die Kollagenmoleküle die Fähigkeit, sich unter einviertel Versetzung zu Fibrillen zusammenzulagern.

Ein wesentlicher Schritt für die Stabilisierung des Fibrillenverbands ist die Ausbildung von kovalenten intermolekularen Bindungen zwischen den einzelnen Molekülen. Dadurch wird das Kollagen unlöslich und die Fibrillen erhalten ihre mechanische Stabilität. Für die Quervernetzung spielen bestimmte Lysin- und Hydroxylysinreste eine entscheidende Rolle (4). In einem ersten Schritt, der wahrscheinlich auf die nichthelikalen Bereiche des Kollagenmoleküls beschränkt ist, wird die oxydative Desaminierung der Lysin- bzw. Hydroxylysinreste durch ein spezielles Enzym katalysiert. Dabei entsteht der  $\delta$ -Semialdehyd der  $\alpha$ -Aminoadipinsäure bzw. die entsprechende Hydroxyverbindung. Diese "Allysine" reagieren in einem zweiten Schritt mit einem im helikalen Teil gelegenen Lysin oder Hydroxylysin eines Nachbarmoleküls unter Bildung einer Schiffischen Base (11,12). Vor kurzer Zeit konnte auch die Beteiligung von Histidin an der Quervernetzung nachge-

wiesen werden (13).

Die Untersuchungen über die Aminosäuresequenz des Kollagens stießen aufgrund der Grösse des Moleküls und der Unlöslichkeit der Fibrillen auf grosse Schwierigkeiten. Die wesentlichen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Sequenzierung waren die Entdeckung des löslichen Kollagens, die Auftrennung von  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Ketten nach Piez (1,14) und die Spaltung des Kollagens mit Bromcyan (15,16).

Bromcyan spaltet die Peptidketten spezifisch am Methioninrest. Methionin ist eine nicht besonders häufig auftretende Aminosäure, sodaß man auch bei den meisten grösseren Proteinen eine übersichtliche Zahl von Bromcyanpeptiden erhält, die dann mit den in der Peptidchemie üblichen Methoden getrennt werden können. Dabei ergibt sich für die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette des Kollagens ein unterschiedliches Peptidmuster, das sich bei Ketten des gleichen Typs von verschiedenen Spezies weitgehend entspricht. Nachdem zuerst die Bromcyanpeptide von Rattenhautkollagen charakterisiert wurden, vereinbarte man auf dieser Basis eine einheitliche Nomenklatur (17-20).

Die  $\alpha 1$ -Kette von Kalbshautkollagen enthält 7 Methioninreste. Die nach der Bromcyanspaltung zu erwartenden 8 Peptide (Abb.1) wurden isoliert und charakterisiert. Die Zuordnung der kleineren, die nur am N-Terminus lokalisiert sind, gelang mit Hilfe von Doppelpeptiden, die Reihenfolge der grossen BrCN Peptiden wurde mit Hilfe des Elektronenmikroskops bestimmt (21).

Diese elektronenoptische Zuordnung beruht auf der Fähigkeit der  $\alpha$ -Ketten und ihrer Fragmente, in vitro die tripelhelikale Struktur zurückzubilden, die dann zu den sogenannten "segment-long-spacing (SLS)" ausgefällt werden können. In den SLS sind Kollagenmoleküle mit ihren Enden abschneidend parallel angeordnet. Sie entstehen aus sauren Lösungen durch Aggregation mit ATP. Beim Anfärben mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat zeigen die SLS ein charakteristisches Querstreifungsmuster, in dem sich die Verteilung der polaren Aminosäuren entlang der Polypeptidkette widerspiegelt. Zu tripelhelikalen Strukturen renaturierte Bromcyanpeptide bilden als Kettenbruchstücke SLS-Fragmente. An Hand ihres Querstreifungsmusters kann man sie einem bestimmten Bereich des gesamten SLS und damit der  $\alpha$ -Kette zuordnen.

Die Sequenz der  $\alpha 1$ -Kette ist durch die Arbeiten an Ratten- und Kalbshautkollagen vollständig aufgeklärt. Von der  $\alpha 1$ -Kette aus Kalbshautkollagen ist die Primärstruktur der Peptide  $\alpha 1$ -CB1 (22),  $\alpha 1$ -CB3 (23),  $\alpha 1$ -CB7 (24) und  $\alpha 1$ -CB6 (5,25,26) von der  $\alpha 1$ -Kette aus Rattenhautkollagen die der Peptide  $\alpha 1$ -CB0 (27),  $\alpha 1$ -CB1 (28),  $\alpha 1$ -CB2 (29),  $\alpha 1$ -CB4 (30),  $\alpha 1$ -CB5 (31) und  $\alpha 1$ -CB8 (32) bekannt.

Die  $\alpha 2$ -Kette von Kalbshautkollagen enthält 4 Methioninreste. Bei der Bromcyanspaltung werden 5 Peptide isoliert (33),  $\alpha 2$ -CB1 mit 12,  $\alpha 2$ -CB0 mit 3,  $\alpha 2$ -CB4 mit 321,  $\alpha 2$ -CB2 mit 30 und  $\alpha 2$ -CB3,5 mit 658 Resten (Abb.1). Die  $\alpha 2$ -Kette aus Rattenhautkollagen besitzt in der Mitte von  $\alpha 2$ -CB3,5

ein zusätzliches Methionin, sodaß 6 BrCN Peptide isoliert werden (34).

Eine andere präparative Methode, um das Kollagenmolekül gezielt zu spalten, ist der limitierte Kollagenaseabbau (35). Bei tiefen Temperaturen ist das native Molekül gegen Enzyme stabil. Nur die Kollegenase aus *Clostridium histolyticum* baut bei  $4-10^{\circ}$  das Molekül von beiden Enden her ab. Aufgrund der Spezifität des Enzyms wird der Abbau in den polaren Sequenzbereichen der Peptidketten mehr oder weniger verzögert und es entstehen Molekülfragmente unterschiedlicher Länge. Wie aus Abb.1 zu ersehen, kommt der Abbau von C-Ende her an einer bestimmten Stelle vollkommen zum Stillstand, sodaß alle Fragmente das gleiche Carboxylende haben. Die Peptide, die nach ihrer im Elektronenmikroskop gemessenen Länge bezeichnet werden, werden durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung zunächst grob getrennt, nach Denaturierung erfolgt dann die chromatographische Isolierung in  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kettenbruchstücke. Die Bromcyanspaltung dieser Kollagenase Fragmente führte zu weiteren definierten kleineren Peptide, die für die Aufklärung der  $\alpha 1$ -Kette eine grosse Hilfe waren.

Abb.1 zeigt die schematische Darstellung der BrCN Peptide und Kollagenasebruchstücke der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette von Kalbshautkollagen.

Von der  $\alpha 2$ -Kette aus Kalbshautkollagen sind bis jetzt nur wenige Sequenzen einiger kurzer Bereiche bekannt, denn die

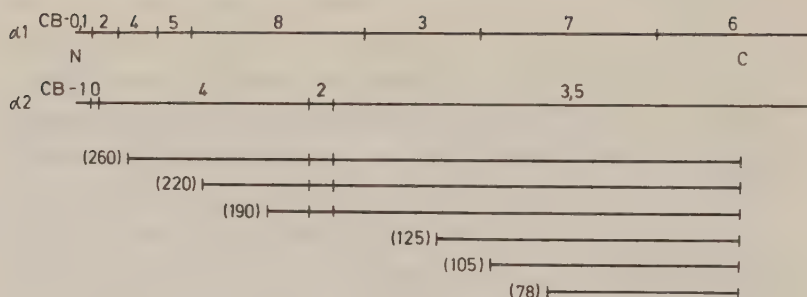


Abb.1: Schematische Darstellung der BrCN Peptide und Kollagenasefragmente der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette von Kalbshautkollagen.

Sequenzierung dieser Kette erwies sich als wesentlich aufwendiger als die der  $\alpha 1$ -Kette. Die Schwierigkeit liegt an der Darstellung genügender Mengen  $\alpha 2$ . Erstens hat Kollagen einen niedrigeren  $\alpha 2$ -Gehalt und zweitens ist die  $\alpha 2$ -Kette mit anderen Polymeren stark überlagert. Auch die Verteilung der Methioninreste entlang der  $\alpha 2$ -Kette ist wesentlich ungünstiger als bei der  $\alpha 1$ -Kette. Obwohl beim Bromcyanabbau fünf Peptide gegenüber acht aus der  $\alpha 1$ -Kette entstehen, umfasst allein das  $\alpha 2$ -CB3,5 mit 658 Resten über 60 % der  $\alpha 2$ -Kette. Durch seine Grösse war es besonders ungeeignet für eine Sequenzierung. Vor einer erfolgreichen Untersuchung war es unbedingt notwendig, eine Fragmentierung zu definierten Bruchstücken durchzuführen.

### 1.1. Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Peptid  $\alpha 2$ -CB3,5 rein zu isolieren und anschließend für eine Sequenzierung in geeignete Bruchstücke zu zerlegen. Nachdem keine spezifische chemische Spaltung zur Verfügung stand, war eine enzymatische Fragmentierung notwendig. In einer ersten Fragmentierung sollten zunächst grosse Bruchstücke erhalten werden, die leicht trennbar und der Lage nach bestimmbar sind. Von den für die Primärstrukturaufklärung der BrCN Peptide der  $\alpha 1$ -Kette mit Erfolg eingesetzten Enzymen Trypsin, Thermolysin und Chymotrypsin erschienen die beiden ersten für diese Aufgabe ungeeignet. So waren nach der Aminosäurezusammensetzung von  $\alpha 2$ -CB3,5 mit Trypsin 55 Peptide zu erwarten. Auch nach der Blockierung von Arginin- bzw. Lysinresten mit speziellen organischen Reagenzien wären zu viele Peptide aufgetreten. Thermolysin spaltet aufgrund seiner breiten Spezifität zu viele Bindungen des Kollagens mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, sodaß auch dieses Enzym ungeeignet für eine Spaltung von  $\alpha 2$ -CB3,5 war.

Als brauchbar erschien dagegen Chymotrypsin, das vorwiegend Bindungen, an denen aromatische und hydrophobe Aminosäuren beteiligt sind, spaltet. Nach der Aminosäurezusammensetzung von  $\alpha 2$ -CB3,5 sollte man wesentlich weniger Peptide erwarten. Die Aufgabe bestand darin, geeignete Spaltungsbedingungen für Chymotrypsin zu finden, die entsprechenden Peptide des  $\alpha 2$ -CB3,5 zu isolieren, näher zu charakterisieren und ihre Reihenfolge entlang der Polypeptidkette lückenlos festzulegen.

## 1.2. Zur Nomenklatur der chymotryptischen Peptide von $\alpha 2$ -CB3,5.

Die chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5 werden nach ihrer später festgestellten Reihenfolge entlang der Polypeptidkette mit C1, C2, C3 und C4 bezeichnet. Abb.2 gibt die Peptide, die isoliert und deren Position entlang der Peptidkette festgelegt werden konnte, wieder. Es wurden aber auch Peptide gefunden, die noch nicht zugeordnet werden konnten. Sie wurden in der Reihenfolge ihrer Elutionen an Molekularsieb-Chromatographie (Bio-Gel P10) nummeriert und sind in Tab.2 zusammengestellt. Zum Teil treten aus einem bestimmten Bereich mehrere Peptide auf, die alle den gleichen N-Terminus haben, aber sich in ihrer Länge unterscheiden, z.B. aus dem C3 Bereich: Sie werden mit C3N1-4 bezeichnet.

Die Peptide C4Ns1 und C4Ns2, die den gleichen N-Terminus haben, sind am N-Terminus etwa 30 Aminosäuren kürzer als C4. C4C ist das C-terminale Peptid von C4.

Abb.2 zeigt schematisch die Zuordnung der chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5 aus Kalbshautkollagen.

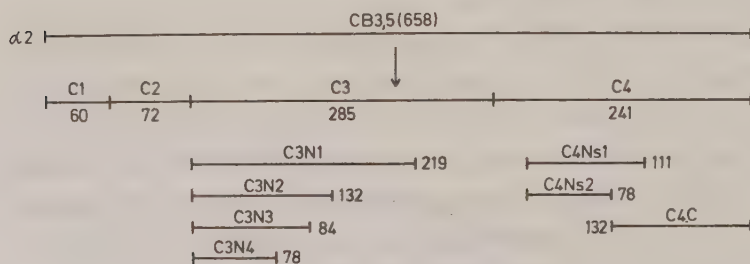


Abb.2: Schematische Darstellung der zugeordneten chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5.

### 1.3. Abkürzungen

|                                               |                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATP                                           | Adenosin-5'-Triphosphat                                                                                                  |
| HLK                                           | Harnstofflösliches Kollagen                                                                                              |
| SLK                                           | Säurelösliches Kollagen                                                                                                  |
| CM-Cellulose                                  | Carboxymethylcellulose                                                                                                   |
| SDS                                           | Natriumdodecylsulfat                                                                                                     |
| Tris                                          | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                                                                          |
| CB-Peptide                                    | Durch Bromcyanspaltung erhaltene Peptide                                                                                 |
| SLS                                           | Molekülzusammenlagerung bei ATP-Fällung<br>(segment-long-spacing)                                                        |
| $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub>                 | Nach Bromcyanspaltung erhaltenes Peptid<br>der $\alpha 2$ -Kette von Kalbshautkollagen                                   |
| $\alpha 2$ -(78)                              | Durch Kollagenaseabbau von nativem Kollagen<br>entstandenes 780Å langes tripelhelikales<br>Fragment des Kollagenmoleküls |
| $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub> -C <sub>4</sub> | Ein chymotryptisches Peptid von $\alpha 2$ -CB <sub>3,5</sub>                                                            |
| TPCK                                          | 1(Tosylamido-2-phenyl)äthyl-chlormethylketon                                                                             |
| PTH-AS                                        | Phenylthiohydantoin-Aminosäuren                                                                                          |
| ATZ-Derivate                                  | Anilinothiazolinon-Derivate                                                                                              |
| Quadrol                                       | (N,N,N',N'-tetrakis-(2-hydroxypropyl)<br>-äthylendiamin)                                                                 |



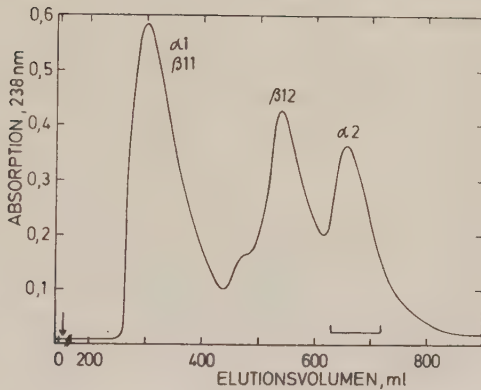


Abb.3: Kettentrennung von harnstoff-löslichem Kollagen an CM-Cellulose in 0,06 m Natriumacetat pH 4,8. Elutionsbedingungen: Linearer Gradient von 0-0,1 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 1000 ml bei 40°.

Aufgetragene Menge: 250 mg

Die BrCN Spaltung der reinen  $\alpha 2$ -Kette, die 4 Methioninreste enthält, ergab erwartungsgemäß 5 Peptide (Abb.1) (33). Zunächst wurden durch Chromatographie an Bio-Gel P4 die drei kleinen ( $\alpha 2$ -CB1,  $\alpha 2$ -CB0 und  $\alpha 2$ -CB2) von den zwei grossen Peptiden ( $\alpha 2$ -CB4 und  $\alpha 2$ -CB3,5) abgetrennt. Die anschließende Trennung von  $\alpha 2$ -CB4 und  $\alpha 2$ -CB3,5 wurde an Phosphocellulose durchgeführt (Abb.4).

Zur weiteren Reinigung und zur Kontrolle des Molekulargewichtes wurde die Fraktion des  $\alpha 2$ -CB3,5 an Bio-Gel A1,5 m rechromatographiert. Die Aminosäurezusammensetzung ist in Tab. 3 angegeben.

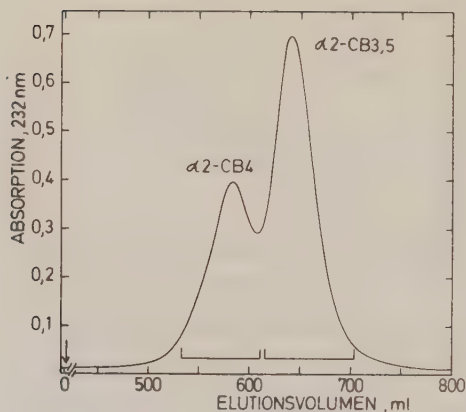


Abb.4: Trennung von  $\alpha 2$ -CB4 und  $\alpha 2$ -CB3,5 an Phosphocellulose in 0,001 m Natriumacetat, pH 3,6. Linearer Gradient von 0-0,5 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 1000 ml bei 40°. (↓) Beginn des Gradienten.  
Aufgetragene Menge: 250 mg

## 2.2. Isolierung von $\alpha 2$ -CB3,5 aus säurelöslichem Kollagen (SLK).

Die unter 2.1. beschriebene Isolierung von  $\alpha 2$ -CB3,5 aus hochgereinigte  $\alpha 2$ -Kette war mit großen Trennaufwand und Substanzverlust verbunden. Es wurde daher versucht, dieses Peptid ohne vorherige Trennung der Ketten direkt aus einem

Gemisch von  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\beta$ -Komponenten zu isolieren. Als Ausgangsmaterial diente säurelösliches Kollagen. Nach der BrCN Spaltung des gesamten SLK wurde das Peptidgemisch an CM-Cellulose pH 3,6 aufgetrennt (Abb.5) (37).

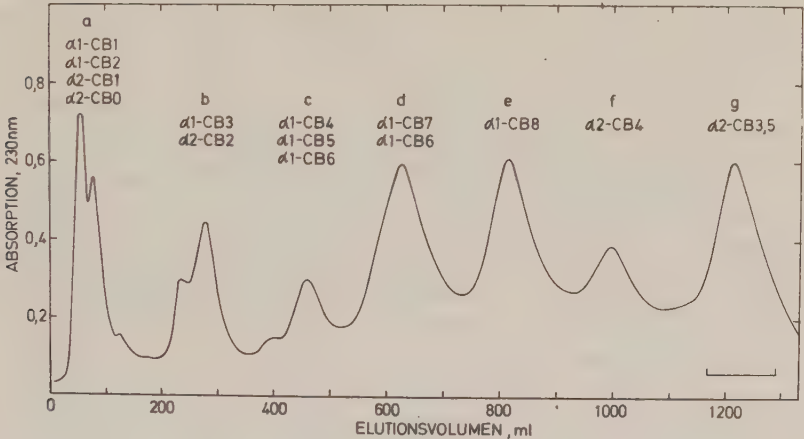


Abb.5: Trennung der BrCN Peptide von SLK an CM-Cellulose, Natriumcitrat pH 3,6. Linearer Gradient von 0,04-0,14 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 1600 ml bei 40°.

Aufgetragene Menge: 250 mg

Die Fraktion g (Abb.5), die das  $\alpha 2$ -CB3,5 enthält, wurde im gleichen System rechromatographiert und anschließend an Bio-Gel Al,5 m gereinigt. Die Aminosäurezusammensetzung stimmte mit dem aus  $\alpha 2$ -Ketten isolierten  $\alpha 2$ -CB3,5 überein. Die so erhaltene Fraktion wurde für die meisten Experimente dieser Arbeit verwendet.

### 2.3. Spaltung von $\alpha 2$ -CB3,5 mit Chymotrypsin.

Das Ziel der Spaltung von  $\alpha 2$ -CB3,5 mit Chymotrypsin war es, diese mit 658 Aminosäuren sehr lange Peptidkette an einigen wenigen Stellen spezifisch zu spalten, um so große und in ihrer Reihenfolge leicht feststellbare Peptide zu erhalten. In einem ersten Versuch wurden 100 mg  $\alpha 2$ -CB3,5 nach Stark (38) 40 Minuten mit Chymotrypsin inkubiert. Diese Abbauphase wurde bei der Aufklärung der  $\alpha 1$ -Kette mit Erfolg verwendet und aus diesem Grund übernommen. Das Abbaugemisch wurde entsalzt (Bio-Gel P2, 200-400 mesh) und an Phosphocellulose pH 3,6 getrennt. Die Chromatographie der chymotryptischen Peptide an Phosphocellulose pH 3,6 zeigte 12 Fraktionen (Abb.6).

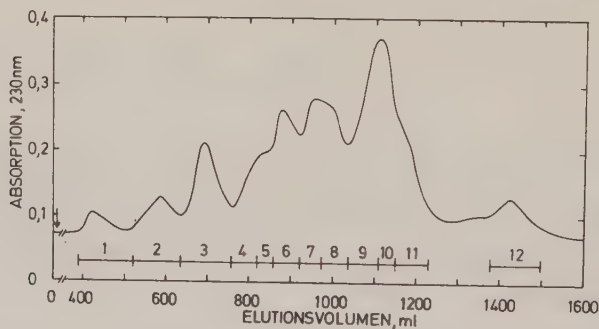


Abb.6: Ionenaustauscher-Chromatographie des Peptidgemisches von  $\alpha 2$ -CB3,5 nach 40 Minuten Spaltung mit Chymotrypsin an Phosphocellulose in 0,001 m Natriumacetatpuffer, pH 3,6. Linearer Gradient von 0-0,5m NaCl über ein Gesamtvolumen von 2000 ml bei 40°. (↓) Beginn des Gradienten. Aufgetragene Menge: 100 mg

Anschließend wurde jede Fraktion am Molekularsieb Bio-Gel P10 rechromatographiert. Dabei stellte sich heraus, daß die meisten Fraktionen mehrere Peptide verschiedener Grösse enthielten, deren vollständige Trennung einen zu grossen Aufwand erfordert hätte. Es wurde daher versucht, das entsalzte Peptidgemisch zuerst an einem Molekularsieb Bio-Gel P10 aufzutrennen. Wie in Abb.7 zu sehen, befand sich die Hauptmenge der chymotryptischen Peptide mit einer Grösse von 70-80 Aminosäuren in Fraktion 4. Auch nach dieser Trennung waren die meisten Fraktionen uneinheitlich.

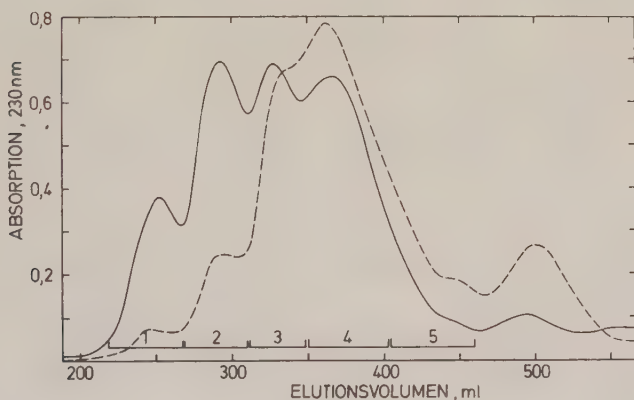


Abb.7: Molekularsieb-Chromatographie des chymotryptischen Peptidgemisches an Bio-Gel P10. Unterbrochene Linie = 40 Minuten Spaltung von  $\alpha$ 2-CB3,5 mit Chymotrypsin, durchgezogene Linie = Fraktion A aus Abb.9 (10 Minuten Spaltung mit Chymotrypsin).

Aufgetragene Menge: 100 mg



Nach diesen Untersuchungen führte die 40 minütige Inkubation von  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin zu einem komplizierten Peptidgemisch. Das eigentliche Ziel, das 658 lange Peptid zunächst in einige wenige Bruchstücke zu spalten, diese in ihrer Lage zueinander zu bestimmen und so einen ersten Überblick zu erhalten, konnte so nicht gelingen. Daraufhin wurde die Abbaupzeit auf 10 Minuten verkürzt.

### 2.3.1. 10 Minuten Spaltung von $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin.

300 mg  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> wurden mit Chymotrypsin 10 Minuten gespalten. Zur besseren Übersicht ist das Prinzip der Auftrennung des Abbaugemisches in Abb.8. wiedergegeben.

Nach Abstoppen der Reaktion durch Ansäuern wurden die Peptide zunächst an Bio-Gel P4 aufgetrennt, um kurze Bruchstücke nicht zu übersehen (Abb.9.).

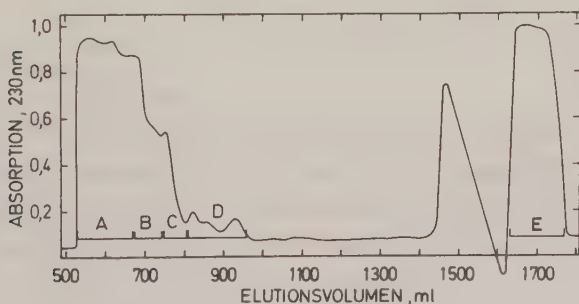


Abb.9: Chymotrypsinspaltung von  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> (10 Minuten). Chromatographie des Abbaugemisches an Bio-Gel P4 in 0,1 m Essigsäure bei Raumtemperatur.

Aufgetragene Menge: 150 mg

Aus dieser Chromatographie wurden fünf Fraktionen A,B,C,D und E gesammelt und weiter untersucht.

Im Salzpeak (Fraktion E) konnte nach Rechromatographie im gleichen System ein Tetrapeptid der Zusammensetzung (Glu, Ser, Gly, Phe) isoliert werden. Die Aminosäurezusammensetzung dieser Fraktion, die als Peptid C5 bezeichnet wurde, ist in Tab.1 wiedergegeben.

Fraktion D wurde an Phosphocellulose rechromatographiert, erwies sich aber als ein kompliziertes Gemisch von Peptiden und wurde wegen der geringen Menge nicht weiter untersucht.

Die Fraktionen C und B enthielten beide je eine Hautkomponente, die durch Chromatographie an Phosphocellulose pH 3,6 und anschließend an Sephadex G50s gereinigt werden konnten (nicht gezeigt). Aus dem Elutionsvolumen der Peptide wurde ihre Länge ermittelt (Abb.10), die Aminosäurezusammensetzung ist in Tab.2 und 3 angegeben.

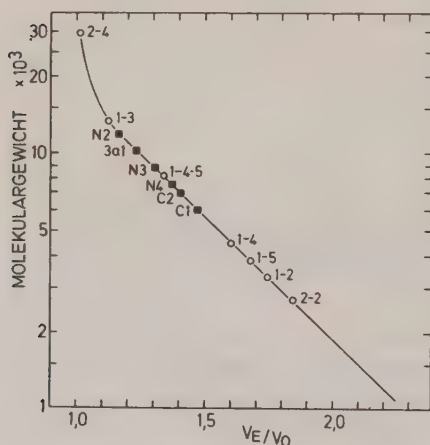


Abb.10: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung der chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5 an Sephadex G50s. Aufgetragen ist das relative Elutionsvolumen ( $V_E/V_0$ ) gegen den Logarithmus des Mol-gew.  $V_E$ =Elutionsvolumen,  $V_0$ =Ausschlußvolumen. (o) Eichpeptide, (■) zu bestimmenden Peptide.

Bezeichnung: 2-4= $\alpha 2$ -CB4,  
1-3= $\alpha 1$ -CB3, 1-4-5= $\alpha 1$ -CB4-5,  
1-4= $\alpha 1$ -CB4, 1-5= $\alpha 1$ -CB5,  
1-2= $\alpha 1$ -CB2, 2-2= $\alpha 2$ -CB2  
N2 =C3N2, N3=C3N3,  
N4=C3N4.

Das Peptid aus der Fraktion B mit 60 Aminosäuren wurde als das N-terminale Peptid C1 identifiziert (siehe Kap.2.7), das aus der Fraktion C mit 27 Aminosäuren konnte nicht lokalisiert werden und wurde als Peptid 6 bezeichnet (Abb.8).

Die Hauptmenge der chymotryptischen Peptide war jedoch in der Fraktion A zu finden. Sie wurden zunächst grob nach dem Molekulargewicht an Bio-Gel P10 aufgetrennt. Daher ergaben sich 5 Fraktionen (1-5) (Abb.7), die, wie von der Übersichtstabelle (Abb.8) dargestellt, alle nach einem einheitlichen Schema weiter untersucht wurden. Als erstes wurde eine Ionenaustauscher-Chromatographie an Phosphocellulose durchgeführt. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden anschließend an einem Molekularsieb gereinigt. Dazu wurden je nach Grösse der Peptide entweder Bio-Gel A1,5 m oder Sephadex G50s verwendet. Bei der Chromatographie an Phosphocellulose pH 3,6 ergaben alle Fraktionen bis auf Fraktion 5 zwei Hauptpeaks (Abb.11, 12 und 13).

Zur weiteren Reinigung und Bestimmung der Länge wurden alle aus der Phosphocellulose-Chromatographie erhaltenen Fraktionen am Molekularsieb aufgetrennt. Dabei erwiesen sich alle Fraktionen bis auf die Fraktionen 3 $\alpha$  (Abb.12) und 4 $\alpha$  (Abb.13) als einheitlich. Diese zwei Fraktionen enthielten, wie die anschließende Molekularsieb-Chromatographie an Sephadex G50s ergab, je zwei Peptide (Fraktion 3 $\alpha$ : 3 $\alpha$ 1 und C3N3, Fraktion 4 $\alpha$ : C3N4 und 4 $\alpha$ 2) (Abb.14).

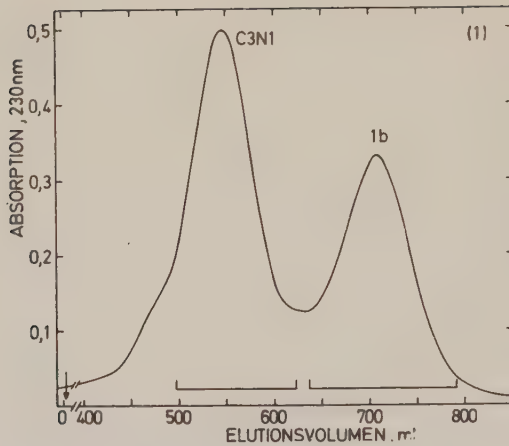


Abb.11: Ionenaustauscher-Chromatographie der aus Bio-Gel P10 erhaltenen Fraktion 1 an Phosphocellulose (Acetatpuffer, pH 3,6, 40°). Linearer Gradient von 0-0,5 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 1000 ml. (↓) Beginn des Gradienten.

Aufgetragene Menge: 100 mg

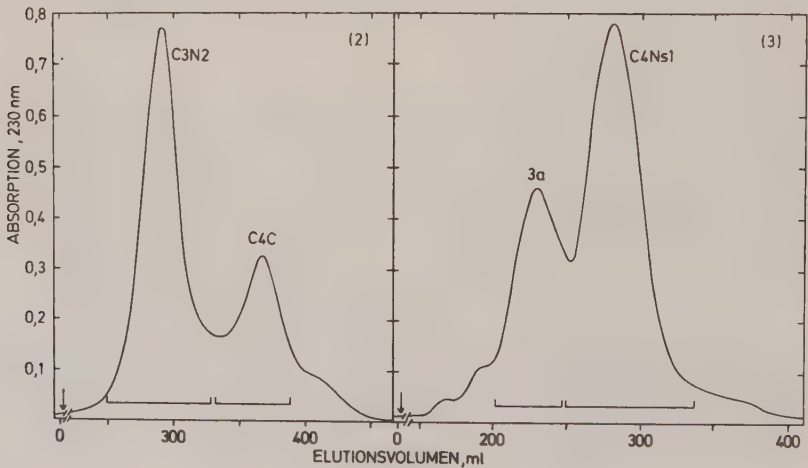


Abb.12: Phosphocellulose-Chromatographie der Fraktionen 2 und 3. Bedingungen wie Abb.11.

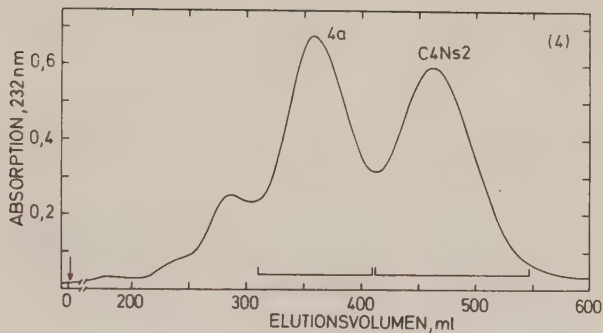


Abb.13: Rechromatographie der Fraktion 4 an Phosphocellulose.  
Bedingungen wie Abb.11.

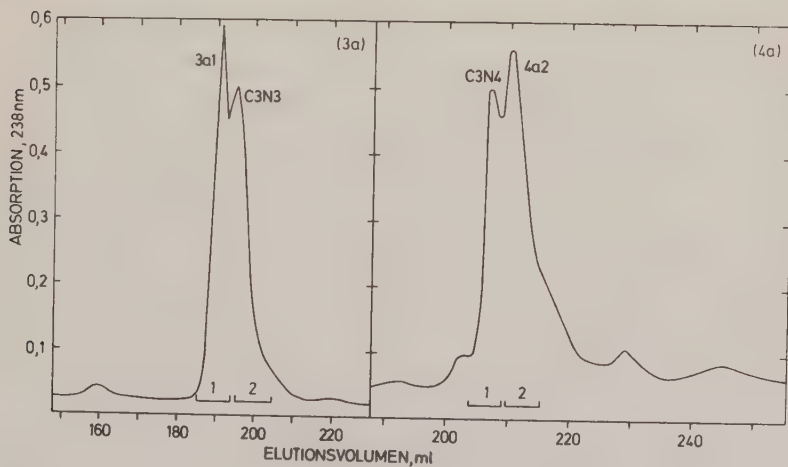


Abb.14: Rechromatographie der Fraktionen 3a und 4a an  
Sephadex G50s (0,03 m Acetatpuffer, pH 4,8 bei 37°).  
Aufgetragene Menge: 40 mg

Aus der Fraktion 5 (Abb.7) wurde nach der Rechromatographie an Sephadex G50s ein Peptid mit 72 Aminosäureresten isoliert, das als chymotryptische Peptid C2 identifiziert werden konnte.

Zur näheren Charakterisierung wurden bis auf Fraktion 1b alle chymotryptischen Peptide dem automatisierten Edman-Abbau unterworfen. Die Peptide 3 $\alpha$ 1, 4 $\alpha$ 2 und 6 (Abb.8) konnten nicht lokalisiert werden, die Zuordnung der übrigen neun ist im Kap. 2.7 beschrieben.

Die Aminosäurezusammensetzung aller chymotryptischen Peptide aus der 10 Minuten Spaltung von  $\alpha$ 2-CB3,5 ist in Tab.1 und 2 wiedergegeben.

Wie aus Abb.8 hervorgeht, wurden aus dem chymotryptischen Abbaugemisch auf diese Weise 13 Peptide isoliert und durch ihre Aminosäurezusammensetzung charakterisiert. Durch die Auswertung der Aminosäureanalysen, des Molekulargewichtes und der Sequenzierung der N-terminalen Bereiche der Peptide stellte sich heraus, daß durch die isolierten Peptide die ganze Kette des  $\alpha$ 2-CB3,5 nicht lückenlos erfasst wurde. Die Summe der Peptide C1 und C2 (Tab.3), des längsten aus dem Bereich C3, C3N1, und der beiden aus dem C4 Bereich, C4Ns1 und C4C, war nur 561 Aminosäuren (Tab.1). Die ganze Kette von  $\alpha$ 2-CB3,5 ist aber 658 Reste lang. Ein Bereich von etwa 100 Aminosäuren fehlte. Es war daher notwendig, das Peptid  $\alpha$ 2 - CB3,5 noch kürzere Zeit zu spalten, um grössere Fragmente zu erhalten.

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung der chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5. Die Werte werden als Aminosäurereste pro Peptid angegeben. Werte unter 10 werden auf eine Stelle hinter dem Komma angegeben, Werte über 10 zur nächsten ganzen Zahl ab- bzw. aufgerundet.

|       |      | *    |      |      | *     | *     | *   |     |       |     |
|-------|------|------|------|------|-------|-------|-----|-----|-------|-----|
|       | C3N1 | C3N2 | C3N3 | C3N4 | C4Ns1 | C4Ns2 | C4C | 1b  | C4CTC | C5  |
| 3-Hyp | 1,2  |      |      |      |       |       |     |     |       |     |
| 4-Hyp | 16   | 8,1  | 7,6  | 5,6  | 7,8   | 6,9   | 9,8 | 17  | 3,5   |     |
| Asp   | 10   | 6,2  | 2,3  | 2,3  | 9,7   | 6,5   | 7,1 | 13  |       |     |
| Thr   | 5,8  | 4,5  | 2,9  | 2,8  | 0,6   |       | 0,5 | 0,5 |       |     |
| Ser   | 7,6  | 4,8  | 4,4  | 3,7  | 2,5   | 1,0   | 4,8 | 7,3 | 2,8   | 0,5 |
| Glu   | 14   | 8,9  | 5,5  | 5,5  | 6,9   | 3,5   | 8,8 | 17  | 2,3   | 0,6 |
| Pro   | 29   | 17   | 9,8  | 9,7  | 12    | 8,7   | 16  | 27  | 6,6   |     |
| Gly   | 73   | 44   | 28   | 26   | 37    | 26    | 44  | 74  | 10    | 1,0 |
| Ala   | 30   | 13   | 9,1  | 7,2  | 11    | 7,1   | 12  | 21  | 1,0   |     |
| Val   | 4,8  | 3,7  | 2,2  | 2,0  | 5,4   | 3,6   | 4,7 | 6,9 |       |     |
| Ile   | 2,8  | 2,7  | 2,1  | 2,0  | 2,0   | 1,5   | 3,0 | 3,5 |       |     |
| Leu   | 4,4  | 2,9  | 2,9  | 3,0  | 2,3   | 0,7   | 4,0 | 6,8 |       |     |
| Tyr   |      |      |      |      | 1,0   | 0,7   | 0,8 | 2,1 | 0,9   |     |
| Phe   | 2,4  | 1,5  |      |      | 1,0   | 0,5   | 0,5 | 1,6 |       | 1,0 |
| Hyl   | 1,9  | 1,2  | 0,8  | 0,8  |       |       | 1,9 | 2,7 |       |     |
| His   |      |      |      |      | 2,3   | 1,6   | 2,6 | 4,5 |       |     |
| Lys   | 4,3  | 2,6  | 2,0  | 2,1  | 2,6   | 1,6   | 2,1 | 3,7 |       |     |
| Arg   | 12   | 8,8  | 4,1  | 4,1  | 6,0   | 3,6   | 6,6 | 11  |       |     |
| Summe | 219  | 132  | 84   | 78   | 111   | 78    | 132 | 222 | 28    | 4   |

( \* ) auch nach der Nachspaltung von  $\alpha 2$ -CB3,5-C3, bzw.  $\alpha 2$ -CB3,5-C4 isoliert

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung der chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5, die nicht zugeordnet werden konnten.

|       | 3 $\alpha$ 1 | 4 $\alpha$ 2 | 6   |
|-------|--------------|--------------|-----|
| Hyp   | 6,8          | 8,5          | 2,0 |
| Asp   | 3,5          | 2,1          | 0,9 |
| Thr   | 4,0          |              | 1,6 |
| Ser   | 3,8          | 2,7          | 1,3 |
| Glu   | 4,0          | 4,5          | 3,1 |
| Pro   | 16           | 9,7          | 2,1 |
| Gly   | 32           | 24           | 9,0 |
| Ala   | 13           | 8,3          | 1,3 |
| Val   | 2,3          | 1,6          | 1,2 |
| Ile   | 1,2          | 1,5          |     |
| Leu   | 1,2          | 1,8          | 0,9 |
| Phe   | 1,1          |              | 0,6 |
| Hyl   | 1,9          |              |     |
| His   |              | 1,4          |     |
| Lys   | 2,1          | 1,1          | 0,6 |
| Arg   | 3,4          | 2,8          | 1,8 |
| Summe | 96           | 72           | 27  |

## 2.4. Kurzzeitspaltung von $\alpha 2$ -CB3,5 mit Chymotrypsin.

### 2.4.1. Spaltung bei verschiedenen Zeiten.

Um eine noch günstigere Abbaupzeit zu ermitteln, wurde folgender Vorversuch durchgeführt:

Je 2 mg gereinigtes  $\alpha 2$ -CB3,5 wurden mit Chymotrypsin unter gleichen Bedingungen ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung pH 7,8,  $37^\circ$ , Substrat: Enzymverhältnis 50:1) 2, 5 und 7 Minuten inkubiert, lyophilisiert und in der SDS-Disc-Elektrophorese analysiert (Abb.15) (39). Diese Methode separiert die Peptide nach ihren Molekulargewichten.

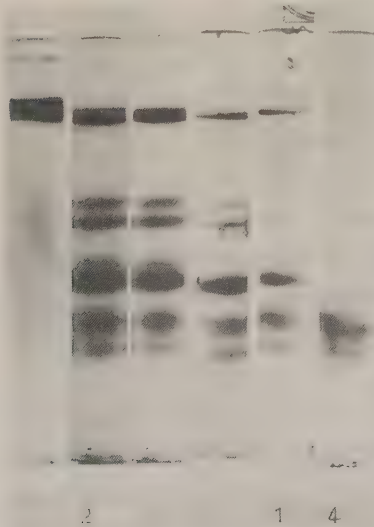


Abb.15: SDS-Disc-Elektrophorese von  $\alpha 2$ -CB3,5 nach Behandlung mit Chymotrypsin. Inkubationszeit 2 Minuten 5, 7, 10 und 40. (0) Ausgangsmaterial.

Laufzeit 3 Stunden

Bei diesem Experiment kann man deutlich erkennen, daß nach 2 Minuten zwei grosse Bruchstücke mit einem Molekulargewicht von etwa 30000 bzw. 25000 neben drei kleineren unter 15000 entstanden sind. Die zwei grossen Fragmente sind bereits nach 10 Minuten zu kürzeren Peptiden umgewandelt. Dabei wird die obere Bande schneller abgebaut. 40 Minuten später ist das ganze  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> zu Bruchstücken mit einem Molekulargewicht von höchstens 8000 gespalten. Eine 2 minütige Inkubation erschien aus diesem Grund erfolgversprechend.

#### 2.4.2. 2 Minuten Spaltung von $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin.

200 mg  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> wurden mit Chymotrypsin 2 Minuten inkubiert. Das Abbaugemisch wurde lyophilisiert und am Molekularsieb Bio-Gel P150 aufgetrennt. Abb.16 zeigt das Elutionsdiagramm des Peptidgemisches an Bio-Gel P150.

Es wurden 5 Fraktionen erhalten. Sie wurden ähnlich wie bei dem 10 minütigen Abbau zuerst durch Ionenaustauscher- und anschließend Molekularsieb-Chromatographie weiter getrennt.

Fraktion 1 erwies sich bei der Rechromatographie an Phosphocellulose als einheitlich und enthielt das Peptid C3. Die Phosphocellulose-Chromatographie der Fraktion 2 ist in Abb.17 wiedergegeben. Der erste Peak bestand aus einem Gemisch mehrerer Peptide, die nicht weiter untersucht wurden, der zweite enthielt das Peptid C4.

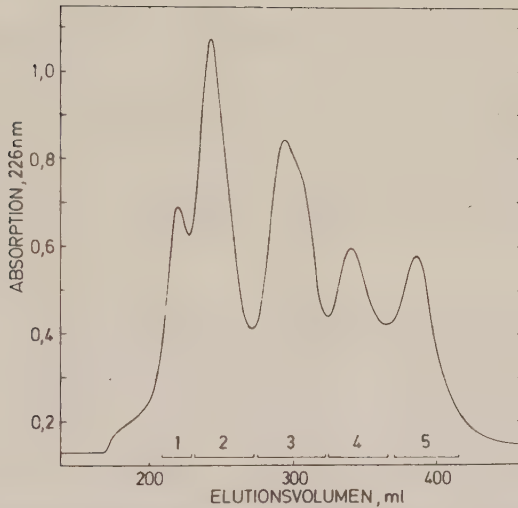


Abb.16: Chymotrypsinspaltung von  $\alpha$ 2-CB3,5 (2 Minuten). Chromatographie an Bio-Gel P150 (0,03 m Acetatpuffer, pH 4,8, 37°).

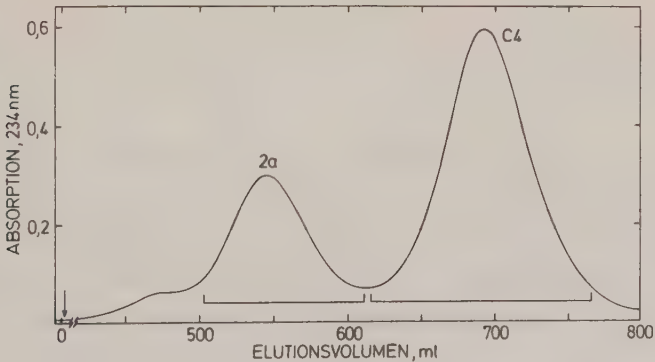


Abb.17: Rechromatographie der aus dem Molekularsieb Bio-Gel P150 erhaltenen Fraktion 2 an Phosphocellulose, pH 3,6 (Acetatpuffer, 40°). Linearer Gradient von 0-0,5 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 1000 ml. (↓) Beginn des Gradienten. Aufgetragene Menge: 50 mg

Die Fraktionen 3 und 4 ergaben bei der Auftrennung an Phosphocellulose zwei bzw. eine Hauptfraktion, die sich nach der Sequenzanalyse als Peptidgemische erwiesen. Eine weitere Reinigung dieser Gemische wurde nicht versucht, weil mit den Peptiden C1, C2, C3 und C4 die ganze Kette des  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> erfasst werden konnte.

Fraktion 5 (Abb.18) enthielt die Peptide C1 und C2, die an Phosphocellulose aufgetrennt werden konnten.

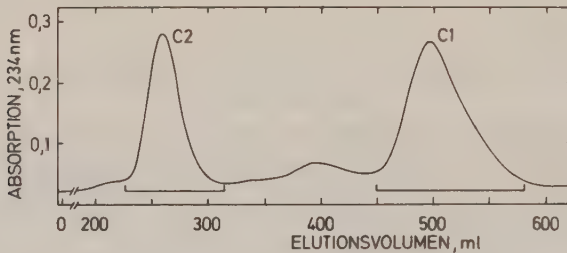


Abb.18: Auftrennung der Fraktion 5 an Phosphocellulose pH 3,6. Bedingungen wie Abb.17.

Die aus der Phosphocellulose-Chromatographie erhaltenen Fraktionen wurden anschließend je nach Grösse am Molekularsieb weiter aufgetrennt. Dazu wurde Bio-Gel P150 (Fraktion 1 und 2) bzw. Sephadex G50s (Fraktion 3, 4 und 5) verwendet. Ihre Aminosäurezusammensetzung ist in Tab.3 wiedergegeben.

Aus dem Abbaugemisch der 2 minütigen Spaltung von  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> mit Chymotrypsin wurden 4 einheitliche Peptide isoliert und durch ihre Zusammensetzung charakterisiert, C1 mit 60,

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung der chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5

|       | $\Sigma$ |     |     |     |             |                   |
|-------|----------|-----|-----|-----|-------------|-------------------|
|       | *        | *   |     |     |             |                   |
|       | C1       | C2  | C3  | C4  | C1+C2+C3+C4 | $\alpha 2$ -CB3,5 |
| 3-Hyp |          |     | 1,0 |     | 1,0         |                   |
| 4-Hyp | 5,5      | 5,8 | 20  | 20  | 52          | 52                |
| Asp   | 4,1      | 3,8 | 12  | 16  | 36          | 35                |
| Thr   |          | 1,3 | 8,6 | 0,6 | 11          | 12                |
| Ser   | 1,4      | 0,6 | 11  | 5,2 | 18          | 19                |
| Glu   | 2,9      | 12  | 20  | 16  | 51          | 52                |
| Pro   | 5,5      | 6,9 | 37  | 29  | 79          | 79                |
| Gly   | 20       | 24  | 95  | 81  | 220         | 219               |
| Ala   | 3,9      | 6,0 | 33  | 21  | 64          | 64                |
| Val   | 1,0      | 1,2 | 7,0 | 11  | 20          | 19                |
| Ile   | 3,4      | 1,3 | 5,1 | 3,9 | 13          | 12                |
| Leu   | 2,0      | 2,4 | 6,5 | 8,7 | 20          | 21                |
| Tyr   |          |     |     | 1,9 | 2           | 2,1               |
| Phe   | 2,0      | 2,4 | 3,1 | 1,9 | 9           | 9,4               |
| Hyl   |          |     | 2,5 | 2,5 | 6           | 7,3               |
| His   | 1,0      |     |     | 5,1 | 6           | 6,3               |
| Lys   | 3,8      | 2,3 | 5,4 | 3,2 | 14          | 14                |
| Arg   | 3,1      | 3,1 | 17  | 13  | 36          | 36                |
| Summe | 60       | 72  | 285 | 241 | 658         | 658               |

\* auch bei der 10 minütigen Spaltung isoliert und charakterisiert.

C2 mit 72, C3 mit 285 und C4 mit 241 Aminosäureresten. Die Summe ihrer Aminosäuren stimmt mit der Aminosäurezusammensetzung von  $\alpha$ 2-CB3,5 gut überein (Tab.3). Die Zuordnung der Peptide wird im Kap. 2.7 beschrieben.

#### 2.5. Nachspaltung von $\alpha$ 2-CB3,5-C3 und $\alpha$ 2-CB3,5-C4 mit Chymotrypsin.

Die Nachspaltung von den zwei grossen Peptiden C3 mit 285 und C4 mit 241 Aminosäureresten hatte folgende Gründe: Erstens sollte versucht werden, kürzere Peptide zu erhalten, um die grossen Fragmente weiter zu charakterisieren und zweitens um auszuschließen, daß das Peptid C2, dessen Position nicht eindeutig festgelegt werden konnte, aus dem Bereich C3 bzw. C4 entsteht.

##### 2.5.1. 8 Minuten Spaltung von $\alpha$ 2-CB3,5-C3 mit Chymotrypsin.

30 mg gereinigtes C3 wurden mit Chymotrypsin 8 Minuten nachgespalten. Das Abbaugemisch wurde nach dem Abstoppen der Reaktion an Sephadex G50s aufgetrennt. Wie in Abb.19 gezeigt ist, sind hauptsächlich 2 Hauptkomponenten entstanden.

Die Fraktionen 1 und 2 wurden anschließend an Phosphocellulose pH 3,6 weiter chromatographiert. Fraktion 1 (132 Reste) erwies sich als einheitlich und wurde aufgrund der Sequenzierung als C3N2 identifiziert (Tab.1).

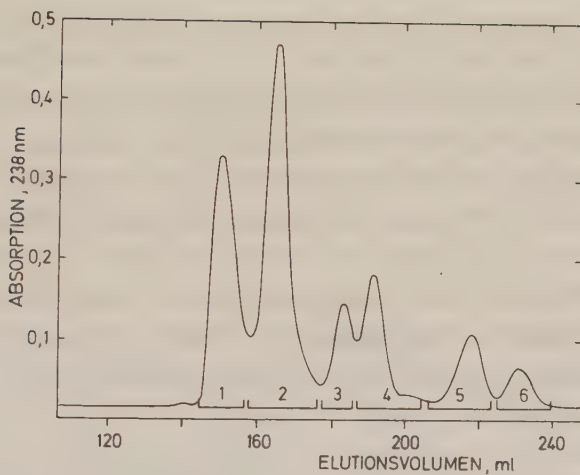


Abb.19: Spaltung von  $\alpha 2$ -CB3,5-C3 mit Chymotrypsin. Auftrennung des Abbaugemisches an Sephadex G50s. Bedingungen wie Abb.16.

Aufgetragene Menge: 30 mg

Fraktion 2 (120 Reste) enthielt zwei Peptide, die nicht getrennt werden konnten. Durch die Aminosäurezusammensetzung und dem Verhalten bei Phosphocellulose-Chromatographie konnte ausgeschlossen werden, daß in dieser Fraktion das Peptid C2 enthalten war. Von der Länge her könnte C2 nur in der Fraktion 4 (81 Reste) enthalten sein. Die Zusammensetzung dieser Fraktion unterscheidet sich aber wesentlich von der des C2. Damit konnte man ausschließen, daß C2 aus dem C3 Bereich entstehen kann.

Die Fraktionen 3 (90 Reste), 5 und 6 wurden nicht näher untersucht.

### 2.5.2. 8 Minuten Spaltung von $\alpha 2$ -CB3,5-C4 mit Chymotrypsin.

30 mg  $\alpha 2$ -CB3,5-C4 wurden 8 Minuten mit Chymotrypsin inkubiert. Abb.20 zeigt die Auftrennung des Peptidgemisches an Sephadex G50s. Die vier untersuchten Fraktionen wurden zur weiteren Reinigung an Phosphocellulose rechromatographiert.

Fraktionen 1,2 und 3 waren einheitlich. Nach der Aminosäurezusammensetzung erwies sich Fraktion 1 mit 132 als C4C, Fraktion 2 mit 111 als C4Ns1 und Fraktion 3 mit 78 Resten als C4Ns2 (Tab.1).

Fraktion 4 (69 Reste) enthält Tyrosin und Histidin wurde aber nicht weiter untersucht. Da die Aminosäurezusammensetzung dieser Fraktion völlig von der des C2 abweicht, kann dieses Peptid auch nicht aus dem C4 Bereich entstanden sein.

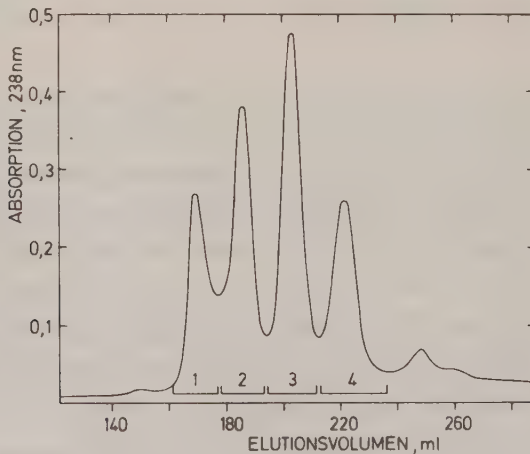


Abb.20: Chromatographie des chymotryptischen Peptidgemisches von  $\alpha 2$ -CB3,5-C4 an Sephadex G50s. Bedingungen wie Abb.16  
Aufgetragene Menge: 30 mg

Die Nachspaltung von  $\alpha 2$ -CB3,5-C3 und  $\alpha 2$ -CB3,5-C4 und die Untersuchung der entstandenen Peptide machte es wahrscheinlich, daß C2 nicht aus diesen Bereichen entstehen kann. Während aus der C3 Region nur das N-terminale Peptid C3N2 identifiziert wurde, konnte man aus dem C4 Bereich die Peptide C4C, C4Nsl und C4Ns2 lokalisieren. Diese Peptide wurden auch bei der 10 minütigen Spaltung von  $\alpha 2$ -CB3,5 mit Chymotrypsin isoliert und charakterisiert. Damit ist auch ihre Zugehörigkeit zu C3 bzw. C4 festgelegt.

#### 2.6. Lokalisierung der zwei Tyrosinreste von $\alpha 2$ -CB3,5.

$\alpha 2$ -CB3,5 enthält zwei Tyrosinreste. Sie sind in dem C-terminalen chymotryptischen Peptid C4 lokalisiert. Ihre Lage ist deshalb interessant, weil sich die Tyrosinreste der  $\alpha 1$ -Kette grundsätzlich nur an den beiden nicht-helikalen Enden befinden. Bei längerer Behandlung von  $\alpha 2$ -CB3,5 mit Chymotrypsin (10 Minuten) entstehen zwei Bruchstücke C4Ns2 und C4C, die jeweils einen Tyrosinrest enthalten (Tab.1). Um die Reihenfolge der Peptide festzulegen, wurde das Kollagenase-Fragment  $\alpha 2$ -(78) verwendet.  $\alpha 2$ -(78) (Abb.26) überdeckt den C-terminalen Bereich von C3 und den grössten Teil von C4 und enthält einen Tyrosinrest. Dieses Peptid ist im C-terminalen Bereich etwa 100 Aminosäuren kürzer als C4. Der zweite Tyrosinrest sollte sich also in dem C-terminalen Bereich von C4 befinden. Durch die Spaltung von  $\alpha 2$ -(78) mit Chymotrypsin sollte

es möglich sein, das Tyrosinpeptid zu isolieren, das in beiden Fragmenten  $\alpha 2$ -(78) und C4 enthalten ist.

Es wurden 40 mg  $\alpha 2$ -(78) mit Chymotrypsin 40 Minuten inkubiert. Das Abbaugemisch wurde entsalzt und anschließend an CM-Cellulose pH 4,8 aufgetrennt (Abb.23).

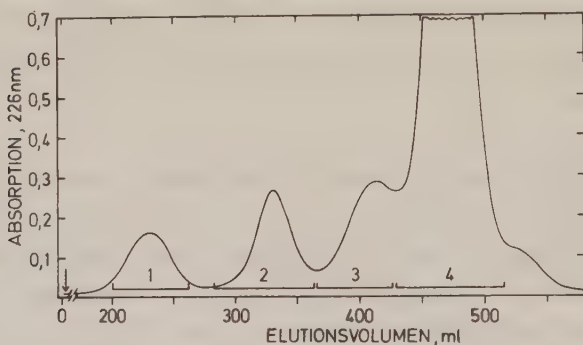


Abb.21: 40 Minuten Spaltung von  $\alpha 2$ -(78) mit Chymotrypsin. Chromatographie an CM-Cellulose pH 4,8, 0,01m Natriumacetatpuffer. Elutionsbedingungen: Linearer Gradient von 0-0,2m NaCl über ein Gesamtvolumen von 800 ml bei 40°.

Die Fraktionen 1,2 und 3 wurden an Molekularsieb Bio-Gel P10 aufgetrennt, und an Phosphocellulose pH 3,6 rechromatographiert. Nach ihrer Aminosäurezusammensetzung enthielten sie keinen Tyrosinrest und wurden nicht weiter untersucht. Fraktion 4 wurde ebenfalls an Bio-Gel P10 rechromatographiert und zeigt zwei Peaks (Abb.22). Die tyrosinhaltige Fraktion 1 spaltete sich bei der Rechromatographie an Phosphocellulose in zwei

Peaks auf, wie Abb.23 zeigt. Der erste Peak, der das Tyrosinpeptid enthielt, wurde nochmal in gleichen System gereinigt und zeigte die gleiche Aminosäurezusammensetzung wie das Peptid C4Ns2 (Tab.1), das auch bei der 10 minütigen Spaltung von  $\alpha 2$ -CB3,5 isoliert werden konnte. Damit ist C4Ns2 im helikalen Bereich von  $\alpha 2$ -CB3,5 lokalisiert.

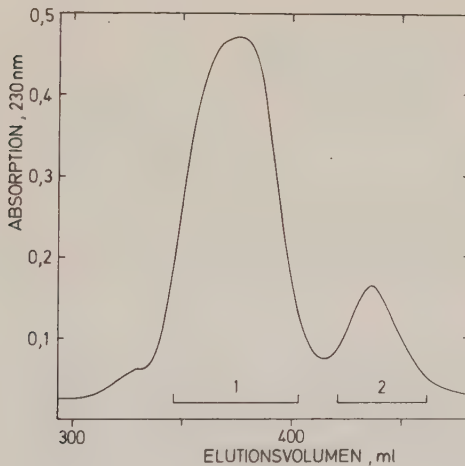


Abb.22: Molekularsieb-Chromatographie der aus CM-Cellulose erhaltenen Fraktion 4 an Bio-Gel P10 in  $\text{CaCl}_2$ /Tris-Puffer bei Raumtemperatur.

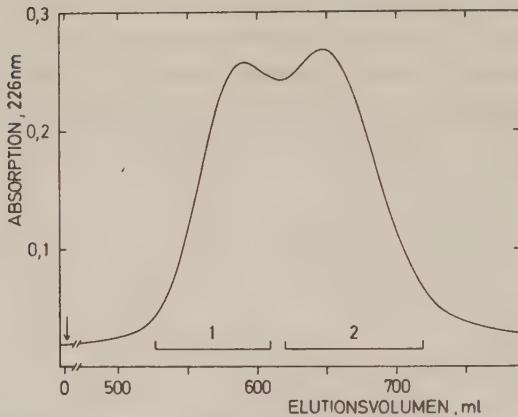


Abb.23: Ionenaustauscher-Chromatographie der aus Bio-Gel P10 erhaltenen Fraktion 1 an Phosphocellulose pH 3,6. Linearer Gradient von 0-0,5 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 1000 ml bei 40°.

C4C enthält den anderen Tyrosinrest von  $\alpha 2$ -CB3,5. Zur näheren Charakterisierung wurde das Peptid mit Trypsin inkubiert und das Abbaugemisch an Bio-Gel P4 aufgetrennt (Abb.24). Nur Fraktion 1 zeigte eine Absorption bei 280 nm und sollte das Tyrosinpeptid enthalten. Diese Fraktion wurde an Phosphocellulose rechromatographiert und mit C4CTC bezeichnet (Abb.25). Die Aminosäurezusammensetzung ist in Tab.1 wiedergegeben. Das Peptid (28 Reste) wurde vollständig sequenziert (Abb.26). Es zeigt eine strenge Homologie zum C-terminalen Bereich der  $\alpha 1$ -Kette (Position 988-1015) und enthält 4 Aminosäurereste des nichthelikalen Bereichs.

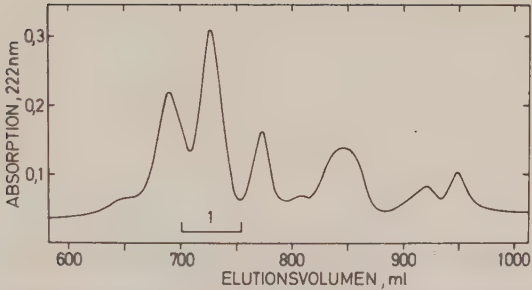


Abb.24: Chromatographie des tryptischen Abbaugemisches von C4C an Bio-Gel P4 in 0,1 m Essigsäure  
Aufgetragene Menge: 6 mg

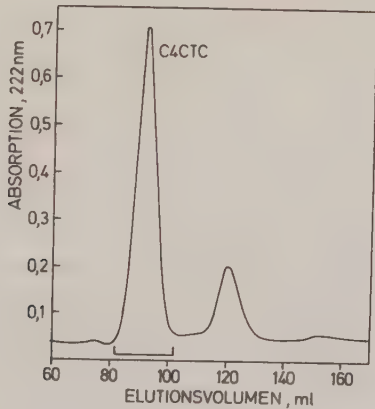


Abb.25: Rechromatographie der Fraktion 1 aus Abb.24 an Phosphocellulose pH 3,6. Linearer Gradient von 0-0,6 m NaCl über ein Gesamtvolumen von 500 ml bei 40°.

## 2.7. Zuordnung der chymotryptischen Peptide von $\alpha 2$ -CB3,5.

Nachdem die chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5 isoliert und durch ihre Aminosäurezusammensetzung charakterisiert wurden, war nun der nächste Schritt, die Position der einzelnen Peptide entlang der Kette festzulegen. Für die Zuordnung der Peptide wurden folgende Kriterien verwendet:

1) Der automatisierte Edman-Abbau.

Mit dieser Methode konnten je nach Peptidzusammensetzung 20-40 N-terminale Sequenzen bestimmt werden (Abb.26).

2) Die Homologie der basischen Aminosäuren (Arginin- und Lysinreste) in dem entsprechenden Bereich der  $\alpha 1$ -Kette.

3) Die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Peptide und

4) Die Renaturierung der Peptide und Ausfällung zu SLS-Fragmenten.

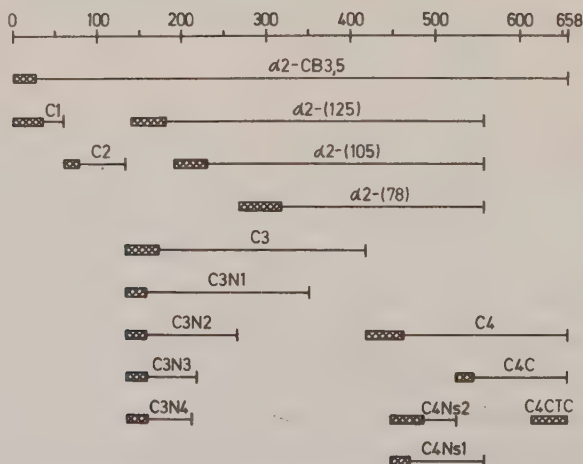


Abb.26: Schematische Darstellung der Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5, die sequenziert wurden. Die schraffierten Kästchen zeigen die sequenzierten Teile der Peptide an.

Die Reihenfolge der chymotryptischen Peptide wurde wie folgt abgeleitet:

C1 wurde als das N-terminale Peptid von  $\alpha 2$ -CB3,5 eindeutig identifiziert, denn die ersten 36 gefundenen Sequenzen, die bestimmt werden konnten, stimmen mit den Sequenzen des gesamten Peptides völlig überein. Aufgrund der Homologie zur  $\alpha 1$ -Kette fängt C1 bei Position 358 an (Abb.28).

Die Position des längsten chymotryptischen Peptids, C3, wurde auf folgende Weise bestimmt:

1) Mit Hilfe des Kollagenase Fragments  $\alpha 2$ -(125).

Die Sequenzierung ergab, daß nach der siebten Aminosäure die Sequenz des C3 völlig identisch mit der des  $\alpha 2$ -(125) ist. Damit ist auch die Position von C3 gesichert, denn  $\alpha 2$ -(125) fängt bei Position 496, zwei Tripletts später als C3, an.

2) Auf elektronenoptischen Wege.

Dazu wurde  $\alpha 2$ -CB3,5-C3 renaturiert und mit ATP als SLS-Fragment gefällt. In Abb. 27 sind die Aufnahmen der SLS-Fragmente von renaturiertem  $\alpha 2$ -CB3,5-C3 (a) und von gesamten Kalbshautkollagen (b) wiedergegeben. Der Vergleich der Querstreifungsmuster bestätigt, daß das Peptid etwa 130 Aminosäuren vom N-Terminus des  $\alpha 2$ -CB3,5 anfängt.

3) Aufgrund der Homologie der Argininreste in Position 498, 501, 507 und 519 und des Lysins in Position 531 mit dem korrespondierenden Teil der  $\alpha 1$ -Kette konnte auch exakt die Position des C3 entlang der Polypeptidkette von  $\alpha 2$ -CB3,5 bestimmt werden (Position 490).

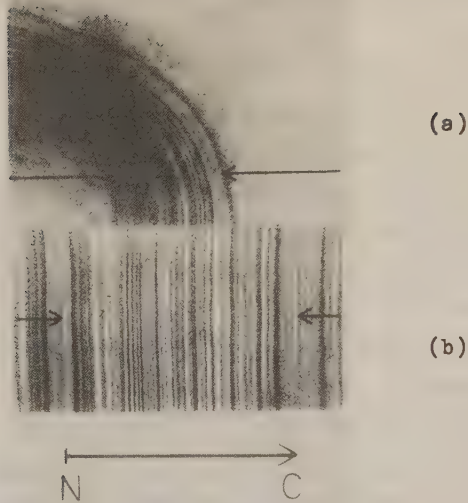


Abb.27: Long-Spacing-Segment-Fragmente von  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub>-C<sub>3</sub> (a) verglichen mit einem SLS von nativem Kalbs-SLK (b). Angefärbt mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat; die Pfeile zeigen die Molekülenden an.

Aus dem Bereich wurden vier verschieden lange Peptide isoliert, C<sub>3</sub>N<sub>1</sub>-4. Sie haben alle die gleiche N-terminale Sequenz wie C<sub>3</sub> und sind damit zugeordnet.

C<sub>4</sub> wurde zunächst aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung als das C-terminale chymotryptische Peptid von  $\alpha 2$ -CB<sub>3,5</sub> zugeordnet. Es enthält, wie das C-terminale BrCN Peptid der  $\alpha 2$ -Kette aus Ratte  $\alpha 2$ -CB<sub>5</sub>, 2 Tyrosin- und 5 Histidinreste. Vergleiche von Sequenzdaten haben nämlich bestätigt, daß

eine strenge Homologie zwischen den gleichen Ketten verschiedener Spezies besteht (40). Zusätzlich konnte mit Hilfe der Homologie der Sequenz des untersuchten N-terminalen Bereichs zur  $\alpha 1$ -Kette die Position des C4 genau festgelegt werden. C4 fängt bei Position 775 an. Auch die Lage der drei kürzeren Peptide aus dem C4 Bereich konnte durch die Sequenzierung bestimmt werden. C4Ns1 und C4Ns2 sind im N-terminalen Teil 30 Aminosäuren kürzer als C4, C4C wurde als das C-terminale Peptid von C4 lokalisiert.

Aufgrund seine Grösse passt C2 nur zwischen C1 und C3. Durch die Sequenzierung des N-terminalen Teils konnten nur 15 Aminosäurereste bestimmt werden, so daß eine einwandfreie Zuordnung aufgrund der Homologie zur  $\alpha 1$ -Kette nicht völlig gesichert ist. Nach diesen vorläufigen Ergebnissen fängt C2 bei Position 417 an.

Durch die Homologie zur  $\alpha 1$ -Kette konnte die Länge der einzelnen Peptide genau bestimmt werden. Dies gilt für C3 mit 285 und C4 mit 241 Resten, für C1 mit 60 und C2 mit 72 Resten jedoch nur bedingt.

Abb.28 zeigt die Sequenzen der chymotryptischen Peptide von  $\alpha 2$ -CB3,5, wie sie durch Edmanabbau ermittelt wurden. Zum Vergleich sind die entsprechenden Bereiche der  $\alpha 1$ -Kette angegeben.

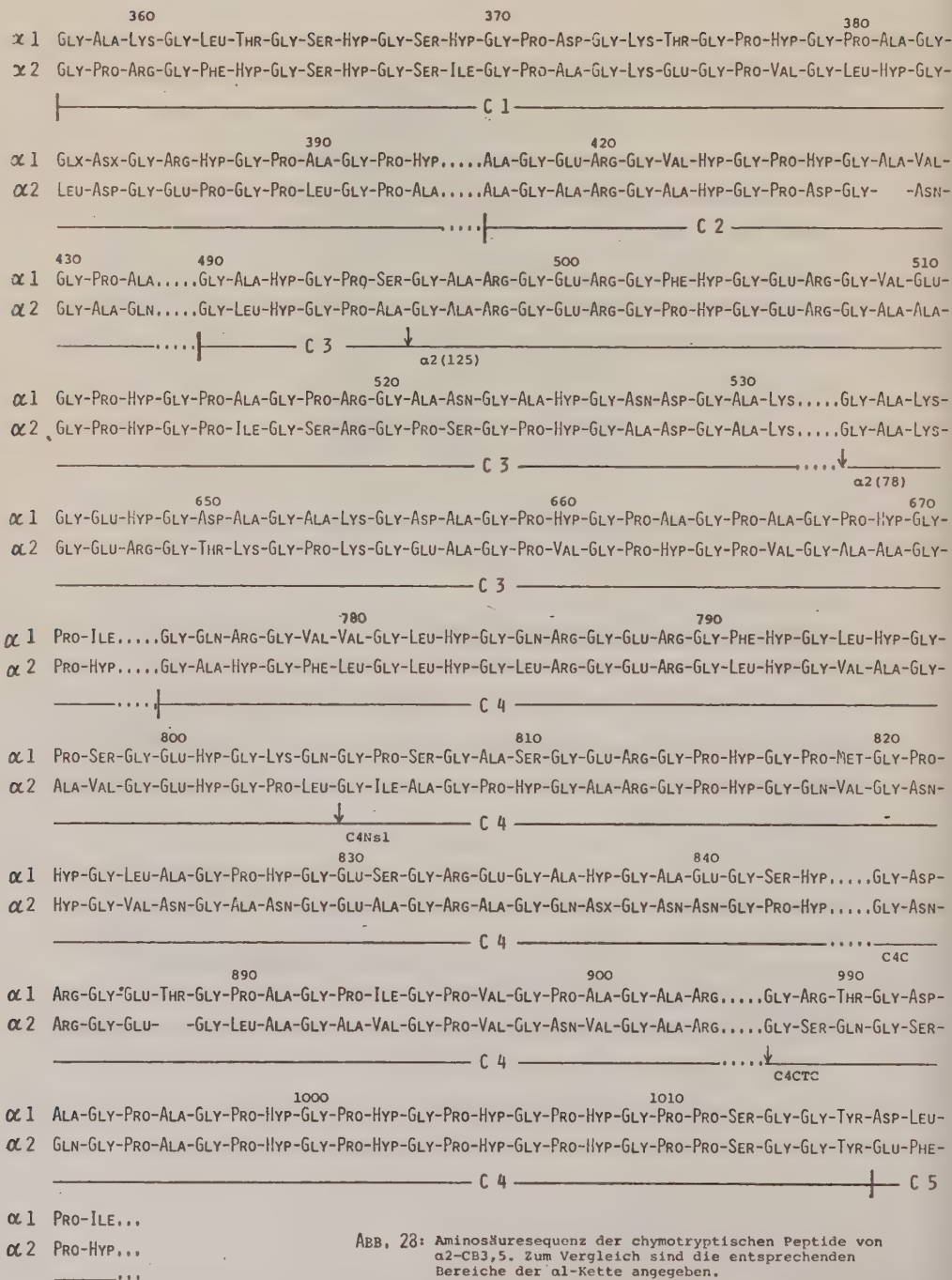


ABB. 28: Aminosäuresequenz der chymotryptischen Peptide von  $\alpha$ 2-CB3,5. Zum Vergleich sind die entsprechenden Bereiche der  $\alpha$ 1-Kette angegeben.

### 3. HOMOLOGIE ZWISCHEN DER $\alpha 1$ - UND $\alpha 2$ -KETTE VON KALBSHAUT- KOLLAGEN

Bei der Auswertung der Sequenz der 1052 Aminosäuren langen  $\alpha 1$ -Kette wurden bestimmte Zusammenhänge zwischen Aminosäuresequenz und Ausbildung der höheren Struktur, wie die der Tripelhelix und der Fibrille, erkannt. So scheint die Stabilität der Tripelhelix nicht nur von dem Gehalt von Prolin und Hydroxyprolin sondern auch von der Verteilung dieser Aminosäuren längs der Peptidkette abzuhängen. Die Fibrillenbildung wird gesteuert durch elektrostatische Kräfte. So sind die polaren Aminosäuren entlang der Kette in bestimmten Bereichen so angeordnet, daß bei der viertelversetzten Anordnung der Moleküle in den Fibrillen die polaren Bereiche benachbarter Moleküle maximal miteinander reagieren können. Ähnliches gilt für die hydrophoben Aminosäurereste. Eine endgültige Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Sequenz und räumlicher Struktur des  $(\alpha 1)_2 \alpha 2$  Moleküls wird aber erst möglich sein, wenn auch die Sequenz der  $\alpha 2$ -Kette mit berücksichtigt werden kann.

Von dem Bromcyanpeptid  $\alpha 2$ -CB3,5, das mit 658 Resten etwa 2/3 der gesamten  $\alpha 2$ -Kette ausmacht, ist durch die Sequenzierung der N-terminalen Bereiche der isolierten Peptide die Sequenz

von 244 Aminosäureresten bestimmt worden. Diese Anzahl erlaubt es, einen ersten Vergleich zwischen  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette zu ziehen. Da aufgrund der Tripelhelixstruktur die Glycinreste in jeder 3. Position entlang der Peptidkette nicht ausgetauscht werden dürfen, d.h. ihre Position stabil ist, sind von den 244 Resten nur 157 austauschbar. Von diesen sind 84 Positionen, das sind 54%, zwischen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  verändert. Betrachtet man die Verteilung der Iminosäuren, so fällt auf, daß die Sequenz der letzten 18 Aminosäurereste der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette am helikalen C-terminalen Ende identisch ist. Dieser Sequenzbereich enthält hauptsächlich die Tripeptideinheit Gly-Pro-Hyp. Da die beiden Ketten in den anderen Bereichen in Bezug auf Prolin und Hydroxyprolinreste nur eine geringe Homologie zeigen, scheint die Sequenz, die eine besonders stabile Tripelhelixstruktur am C-terminalen Ende verursacht, für das Kollagenmolekül von besonderer Bedeutung zu sein.

Besonders interessant ist die Verteilung der polaren Aminosäuren die das Ladungsmuster des Kollagenmoleküls bestimmen. Die geringste Variabilität findet man bei den basischen Aminosäuren. Von 22 Positionen, die in der  $\alpha 1$ - bzw.  $\alpha 2$ -Kette mit einer basischen Aminosäure besetzt sind, wurden nur 6 Substitutionen gefunden, die mit einer

Änderung des Ladungsmusters einhergehen. In 5 Fällen ist eine Base gegen eine apolare aber nicht hydrophobe Aminosäure ausgetauscht und nur in einem Fall ist ein Arginin (Position 386) durch einen entgegengesetzt geladenen Aminosäurerest ersetzt (Glutaminsäure). Das ist eine Änderung von 27 %. Bei den sauren Aminosäuren ist diese hohe Konstanz nicht zu beobachten. In 21 Positionen gibt es 11 Austausche, von sauren gegen apolare nicht hydrophobe Aminosäurereste. Es fällt auf, daß die  $\alpha 1$ -Kette in dem untersuchten Bereich mehr negativ geladene Aminosäurereste besitzt als die  $\alpha 2$ -Kette.

Besonders hoch ist die Austauschrate bei den hydrophoben Aminosäureresten. In den 30 Positionen, die mit einem hydrophoben Rest besetzt sind, findet man 28 Veränderungen. In 9 Fällen ist es ein Austausch zwischen hydrophoben Resten, in 19 Fällen wird ein hydrophober Rest durch einen apolaren Rest ersetzt. Dabei enthält die  $\alpha 2$ -Kette wesentlich mehr hydrophobe Reste als die  $\alpha 1$ -Kette. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bis auf die Position der basischen Aminosäurereste, die in  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  verhältnismässig konstant sind, die Homologie zwischen beiden Ketten geringer ist als man früher angenommen hat. Diese ersten Ergebnisse scheinen darauf hinzuweisen, daß die

$\alpha 2$ -Kette die Bildung der höheren Struktur wie die Aggregation der Moleküle zu den Fibrillen wesentlich mitbeeinflusst. Frühere EM-Untersuchungen führten zu anderen Schlußfolgerungen. So gelang es, aus 3  $\alpha 1$ -Ketten ein künstliches Kollagenmolekül aufzubauen, das in vitro Fibrillen des nativen Typs bildet die im EM von den Fibrillen aus den nativen Molekülen nicht zu unterscheiden sind. Über die Rolle der  $\alpha 2$ -Kette im Typ I wird man erst nach Kenntnis der gesamten Sequenz einigermaßen gesicherte Vorstellungen entwickeln können.

#### 4. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, in Annäherung zur  $\alpha 1$ -Kette, deren Aminosäuresequenz jetzt vollständig bekannt ist, entsprechende Untersuchungen an der  $\alpha 2$ -Kette durchzuführen. Die Aufgabe bestand darin, das grösste Bromcyan Peptid dieser Kette,  $\alpha 2$ -CB3,5 mit 658 Resten, zu isolieren und gezielt in wenige überschaubare Bruchstücke zu spalten. Da dieser grosse Bereich keine Methioninreste enthält (41), kam zur weiteren Spaltung die zuverlässig arbeitende Bromcyanmethode nicht in Frage. In dieser Arbeit wurde daher versucht, die Spaltung mit Chymotrypsin durch-

zuföhren. Dabei stellte sich zunächst heraus, daß eine chymotryptische Spaltung von 40 Minuten und auch von 10 Minuten eine große Anzahl von Peptiden ergab, die ohne grossen experimentellen Aufwand nicht lückenlos zu isolieren waren. Erst eine Verringerung der Spaltungszeit auf 2 Minuten ergab ein übersichtliches Gemisch, aus dem, 4 chymotryptische Peptide C1 mit 60, C2 mit 72, C3 mit 285 und C4 mit 241 Resten isoliert wurden, deren Summe die ganze Kette des  $\alpha 2$ -CB3,5 ausmacht. Diese Peptide wurden durch Kombination von Molekularsieb- und Ionenaustauscher-Chromatographie isoliert und durch Molekulargewichtsbestimmung und Aminosäureanalyse charakterisiert. Durch Nachspaltung der beiden grossen Peptide C3 und C4 konnte eine Anzahl kleinerer Peptide dieser Bereiche isoliert werden.

Zur ersten Orientierung wurden alle isolierten Peptide mit Hilfe des automatisierten Edman-Abbaus sequenziert. Dabei gelang es, durchschnittlich 15 bis 45 Sequenzen der N-terminalen Bereiche aufzuklären. Insgesamt wurde etwa ein Drittel der Sequenz des  $\alpha 2$ -CB3,5 bestimmt. Mit Hilfe der Sequenz der einzelnen Peptide und ihrer Homologie zur  $\alpha 1$ -Kette gelang es, die Reihenfolge der chymotryptischen Peptide zu bestimmen und ihre Positionen entlang der  $\alpha 2$ -Kette genau festzulegen.

Der Vergleich der Teilsequenzen der  $\alpha 2$ - mit der  $\alpha 1$ -Kette ergab eine überraschend geringe Homologie zwischen den beiden Ketten. Eine strenge Homologie war nur in

der Lage der basischen Aminosäuren entlang der Kette zu beobachten. Bei diesen grossen Unterschieden zwischen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  war es auffallend, daß die 18 C-terminalen Sequenzen des tripelhelikalen Bereiches bei  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  identisch sind. Sie enthalten ausschließlich Tripeptid-einheiten welche die Tripelhelix stabilisieren. Für das Kollagenmolekül scheint daher eine besonders stabile Struktur am C-terminalen Ende wichtig zu sein. An den tripelhelikalen Bereichen schließt sich auch in der  $\alpha 2$ -Kette ein nichthelikaler Abschnitt an. Der nichthelikale Bereich in der  $\alpha 1$ -Kette ist 25 Aminosäuren lang. Es stellte sich heraus, daß während der Isolierung des löslichen Kollagens aus der Haut dieser Bereich durch vorhandene Gewebsproteasen sehr leicht abgespalten werden kann. Es waren spezielle Isolierungsmethoden notwendig, um den gesamten nichthelikalen Bereich am C-terminalen Ende der  $\alpha 1$ -Kette zu erfassen. Das gleiche scheint auch für die  $\alpha 2$ -Kette zu gelten. In diesen Untersuchungen konnte nur ein 8 Reste langer nichthelikaler Bereich gefunden werden.

Mit dieser Arbeit wurde die Voraussetzung für eine vollständige Sequenzierung des  $\alpha 2$ -CB3,5 geschaffen. In folgenden Untersuchungen wird es notwendig sein, die chymotryptischen Peptide in grösseren Mengen herzustellen, mit anderen Enzymen nachzuspalten und die jetzt kürzeren Peptide ebenfalls zu isolieren und zu sequenzieren.

## 5. EXPERIMENTELLER TEIL

### 5.1. Harnstofflösliches Kollagen (HLK)

Der zerkleinerte Mittelspalt einer 2-5 kg schweren Kalbshaut wurde mit einer Eiswasser/Harnstofflösung einmal gewaschen. Nach dem Abdekantieren wurde die Haut mit einer 10m Harnstofflösung bei Raumtemperatur unter kräftigem Rühren 2 Std. extrahiert. Die Endkonzentration an Harnstoff war 8m. Es wurde 1 Std. bei 23.000 g abzentrifugiert und der Rückstand ein zweites Mal mit einer 8 m Harnstofflösung 2 Std. extrahiert. Der erste Extrakt war 0,48%, der zweite 0,21% an Kollagen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die spezifischen optischen Drehwerte der Kollagenlösungen bei 405nm herangezogen ( $[\alpha]_{405} = -1000$  für native und  $-360$  für denaturierte Extrakte). Die klaren Extrakte wurden gegen 0,02 m Acetatpuffer, pH 4,8 dialysiert und an CM-Cellulose chromatographiert.

### 5.2. Darstellung der $\alpha$ -Ketten

#### a) Isolierung der $\alpha_2$ -Kette

200-250 mg HLK wurden nach 30 Minuten Denaturierung bei  $40^{\circ}$  auf einer mit Startpuffer äquilibrierten 2,5x15cm CM-Cellulosesäule (Whatman mikrogranular CM 52) bei einem Durchfluß von ca. 180 ml/h und einer Säulentemperatur von  $40^{\circ}$  in  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Ketten aufgetrennt (1). Der Startpuffer (pH 4,8) enthielt 0,06 m Natriumacetatpuffer, der Limitpuffer zusätzlich 0,1 m NaCl. Die eluierte  $\alpha_2$  Fraktion wurde an Bio-Gel P2 entsalzt und gefriergetrocknet.

b) Rechromatographie der  $\alpha 2$  Fraktion an CM-Cellulose pH 4,8

Nach der Reisfeld Disk-Elektrophorese (36) war die  $\alpha 2$  Fraktion nicht sauber. Es wurde, wie oben beschrieben, bei gleichen Bedingungen an CM-Cellulose rechromatographiert.

c) Rechromatographie der  $\alpha 2$  Fraktion an Bio-Gel A1,5m 200-400 mesh in 1 m  $\text{CaCl}_2$ /0,05 m Tris-Puffer pH 7,5.

Das so erhaltene Produkt wurde noch einmal rechromatographiert, um Reste von  $\beta$ -Komponenten (2 durch kovalente Bindung quervernetzte  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Ketten) zu entfernen.

### 5.3. Chromatographische Methoden

Die verwendete chromatographische Trenneinheit bestand aus einer Säule, einer Perpexpumpe (LKB), einer Spektralphotometereinheit (Beckman DB) mit Schreiber und einem Fraktionssammler. Der Proteingehalt wurde bei unterschiedlicher Wellenlänge kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet.

#### 5.3.1. Ionenaustauschchromatographie

##### 5.3.1.1. Chromatographie an Phosphocellulose

100 mg gefriergetrocknetes Peptidgemisch wurden in 10ml Startpuffer gelöst und auf eine 2,5 x 13 cm Säule, gefüllt mit Phosphocellulose (Whatman P11 mikrogranular) aufgetragen.

Die Säule war vorher mit Startpuffer äquilibriert und wurde bei 40° aufsteigend mit einem linearen Natriumchloridgradienten mit je 500 ml Start- und Limitpuffer eluiert. Startpuffer war 0,001 Natriumacetatpuffer, pH 3,6, im Limitpuffer war noch zusätzlich 0,5 m NaCl. Das Eluat wurde bei einer Pumpgeschwindigkeit von 180 ml/h in 9 ml Fraktionen aufgefangen.

#### 5.3.1.2. Chromatographie an CM-Cellulose

Für die Kettentrennungen wurde das Verfahren von Piez et al. (1) angewendet. Es wurde in 0,06 m Natriumacetatpuffer, pH 4,8, über einen linearen Gradienten von 0-0,1 m NaCl bei 40° chromatographiert. Die aufgetrennten Fraktionen wurden entsalzt und lyophilisiert.

#### 5.3.2. Gelchromatographie

##### 5.3.2.1. Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel P2 100-200mesh

Um die Fraktionen salzfrei zu erhalten, wurde an einer 4 x 50 cm Säule mit Bio-Gel P2 100-200 mesh entsalzt, die bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 200 ml/h mit 0,1 m Essigsäure eluiert wurde. Für die Auftrennung kleiner Peptide mit weniger als 15 Aminosäuren wurde an Bio-Gel P2 200-400 mesh bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/h entsalzt.

##### 5.3.2.2. Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel P4 200-400 mesh

Die Trennungen an Bio-Gel P4 wurden bei Raumtemperatur an einer

4,5 x 150 cm Säule durchgeführt. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 87 ml/h wurden die Peptide in 7,3 ml Fraktionen mit 0,1 m Essigsäure eluiert, gesammelt und anschließend lyophilisiert.

#### 5.3.2.3. Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel P10 200-400mesh

Bis zu 100 mg Peptidgemisch wurden auf eine 4 x 120 cm Säule mit Bio-Gel P10 (BioRad Laboratories) aufgetragen und bei Raumtemperatur mit 1m  $\text{CaCl}_2$ /0,05 m Tris-Puffer, pH 7,5, bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/h in 7,5 ml Fraktionen eluiert.

#### 5.3.2.4. Molekularsiebchromatographie an Sephadex G50 superfine

30 mg salzfreies Peptidgemisch wurden in 2 ml 0,03 m Natriumacetatpuffer, pH 4,8, auf eine 2 x 140 cm auf 37° thermostatisierte Säule mit Sephadex G50 superfine (Pharmacia, Schweden) aufgetragen. Die Elutionsgeschwindigkeit bei 4 Fraktionen/h war 21 ml/h.

#### 5.3.2.5. Molekularsiebchromatographie an Bio-Gel P150 100-200mesh

Bis zu 100 mg gefriergetrocknetes Peptidgemisch wurden an einer bei 37° thermostatisierten Säule (3,3 x 118cm) in 0,03m Natriumacetatpuffer, pH 4,8, aufgetrennt. Bei einer Pumpengeschwindigkeit von 23 ml/h wurden 5 Fraktionen/h gesammelt.

#### 5.4. Chemische und enzymatische Spaltungen

##### 5.4.1. Bromcyanspaltung

Die  $\alpha$ 2-Kette von Kalbshautkollagen wurde wie bei Butler et al. (17) beschrieben mit Bromcyan gespalten. 100 mg wurden in 10 ml 0,1 m Essigsäure gelöst, bei 40° 30 Minuten denaturiert, mit 6n HCl auf pH 1,5 gebracht und 4 Stunden bei 30° mit einem 100-fachen molaren Überschuß von Bromcyan, bezogen auf Methionin, gespalten, anschließend an Bio-Gel P2 100-200 mesh entsalzt und gefriergetrocknet. Die Isolierung und Reinigung der BrCN Peptide der  $\alpha$ 2-Kette wurde wie bei Fietzek (33) beschrieben durchgeführt.

##### 5.4.2. Chymotrypsinspaltung

$\alpha$ 2-CB3,5 wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in 0,2 m Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,8, aufgelöst und mit einer Lösung von 1 mg Chymotrypsin (Worthington USA, 48,8 U/mg) in 1 ml 0,001 m  $\text{CaCl}_2$ /0,001 m HCl im Verhältnis Substrat/Enzym=50:1 versetzt. Die Inkubationszeiten betrugen bei 37° 40, 10, 8 und 2 Minuten. Der Abbau wurde durch Ansäuern auf pH 3,5 gestoppt. Das Peptidgemisch wurde nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur entsalzt und lyophilisiert.

##### 5.4.3. Trypsinspaltung

Die Peptide wurden in Konzentrationen von 5 mg/ml in 0,2 m Ammoniumhydrogencarbonatpuffer, pH 7,8, aufgelöst und mit

einer Lösung von 1 mg Trypsin (zweimal krist., Worthington Biochemical Co., USA) in 1 ml 0,001 m Calciumchlorid/0,001 m Salzsäure im Verhältnis Substrat/Enzym=50:1 versetzt. Nach vier Stunden Inkubation bei 37° wurde der Abbau durch Ansäuern gestoppt. Das Trypsin war zur Blockierung der chymotryptischen Aktivität vorher mit 1-(Tosylamido-2-phenyl)äthyl-chlormethylketon (TPCK) behandelt worden (42).

## 5.5. Analytische Methoden

### 5.5.1. Aminosäureanalyse

0,2 bis 0,5 mg Protein wurden mit 1 ml 6N HCl versetzt und bei 110° 24 Std. unter Stickstoff hydrolysiert. Die Probe wurde nach der Hydrolyse zur Trockne eingedampft. Die Analysen wurden in einem Einsäulenverfahren mit einem automatischen Aminosäureanalysator Biochrom BC 200 (Biocal, München) durchgeführt. Durch diese drastischen Bedingungen sind Hydrolyseverluste bei Threonin und Serin zu beobachten. Um dies auszugleichen wurden die Werte für Threonin und Serin mit den Faktoren 1,21 bzw. 1,08 korrigiert (37).

### 5.5.2. Molekulargewichtsbestimmungen

Um das Molekulargewicht der untersuchten Peptide zu ermitteln, wurde die Gelchromatographie an Bio-Gel P150, P10 und Sephadex G50s verwendet. Die Säulen waren mit verschiedenen bekannten Kollagenpeptiden geeicht. Dabei ist  $V_E/V_0$  proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts.

( $V_E$ =Elutionsvolumen,  $V_0$ =Ausschlußvolumen).

### 5.5.3. SDS-Disk-Elektrophorese

Diese Methode erlaubt neben der Reinheitsprüfung der Peptide auch eine Abschätzung der Molekulargewichte, wenn man nach der Eichung mit bekannten Peptiden die Wanderungsdistanz vergleicht. Die SDS-Disk-Elektrophorese wurde nach Furthmayr und Timpl durchgeführt (39). Als Kammerpuffer diente 0,1 m Phosphat, pH 7,2, mit 0,1% SDS. Die Proben wurden in 0,01 m Phosphatpuffer, pH 7,2, mit 0,2% SDS und 2m Harnstoff aufgenommen und bei 40° eine halbe Stunde denaturiert. Es wurden 0,02-0,04 mg Protein aufgetragen und die Elektrophorese bei 6mA/Gelröhrchen (6cm) ausgeführt. Als Polyacrylamid-Gele (Acrylamid und Methylenbisacrylamid, Serva) wurden 7,5%-ige Gele verwendet. Die Anfärbung mit 0,25% Comassie Brilliant Blue in 20% Trichlor-essigsäure dauerte 2 Std. Der überschüssige Farbstoff wurde mit 7% Essigsäure in 18-20 Std. entfernt.

### 5.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die zu untersuchenden Peptide wurden nach Rauterberg und Kühn (21) gegen 0,225 m Citratpuffer, pH 3,7, dialysiert und zunächst 20 Minuten bei 36° denaturiert. Die Temperatur der Lösung wurde so weit erniedrigt, bis sich ein erster Anstieg der optischen Drehung bei 405 nm zeigte. Anschließend wurde mehrere Tage bei 10-15° renaturiert. Die renaturierte Lösung wurde bei 4° gegen 1% Essigsäure

dialysiert. Die Ausfällung der Segmente erfolgte durch Dialyse gegen 0,4%-ige ATP-Lösung (Serva), pH 2,8, bei 4°. Nach Aufbringen der Segmentsuspension auf einen Objektträger (Blende mit einem Kollodium-Kohlefilm bedeckt) wurde mit Phosphorwolframsäure angefärbt und mit Uranylacetat nachkontrastiert. Die Aufnahmen wurden am Elmiskop I (Siemens und Halske, Berlin) bei einer Spannung von 80kV ausgeführt.

### 5.7. Sequenzierung

Die automatische Sequenzanalyse nach Edman und Begg (43) wurde am "Protein-Peptide-Sequenzer" (Beckman Instruments, Palo Alto, Californien) durchgeführt. Es wurde das "double cleavage"-Quadrolprogramm benutzt. Die Umwandlung der abgespaltenen ATZ-Derivate in die PTH-Aminosäuren erfolgte in 0,1 n HCl bei 80° (10 Minuten). Die PTH-Aminosäuren wurden an Dünnschichtplatten (44) (Kieselgel F 254, 20x20, Merck Darmstadt) oder im Gaschromatographen (45) GC-45 (Beckman Instruments, Palo Alto, Californien) identifiziert.

6. LITERATUR

1. Piez, K.A., Eigner, E.A., Lewis, M.S.  
Biochemistry 2 (1963), 58
2. Rich, A., Crick, F.H.  
J. Mol. Biol. 3 (1961), 483
3. Traub, W., Yonath, A., Segal, D.M.  
Nature 221 (1969), 914
4. Traub, W., Piez, K.A.  
Adv. Prot. Chem. 25 (1971), 243
5. Rauterberg, J., Fietzek, P.P., Rexrodt, F.W., Becker, U.,  
Stark, M., Kühn, K.  
FEBS Letters 21 (1972), 75
6. Müller, P.K., Mc Goodwin, E., Martin, G.R.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44 (1971), 110
7. Bornstein, P., v.d.Mark, K., Wyke, A.W., Ehrlich, H.P.,  
Monson, J.M. J. Bio. Chem. 247 (1972), 2808
8. Smith, B.D., Byers, P.H., Martin, G.R.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 69 (1972), 3260
9. Burgeson, R.E. Wyke, A.W., Fessler, J.H.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48 (1972), 892
10. Dehm, P., Jimenez, S.A., Olsen, B.R., Prockop, D.J.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 69 (1972), 60
11. Bailey, A.J.  
Biochem. Biophys. Acta 160 (1968), 447

12. Bailey, A.J., Fowler, L.J., Peach, C.M.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 (1969), 663
13. Tanzer, M.L. et al.  
J. Biol. Chem. 248 (1972), 393
14. Piez, K.A., Lewis, M.S., Martin, G.R., Gross, J.  
Biochem. Biophys. Acta 53 (1961), 596
15. Gross, E., Witkop, B.  
J. Am. Chem. Soc. 83 (1961), 510
16. Bornstein, P., Piez, K.A.  
Science 148 (1965), 1353
17. Butler, W.T., Piez, K.A., Bornstein, P.  
Biochem. 6 (1967), 3771
18. Fietzek, P.P., Piez, K.A.  
Biochem. 8 (1969), 2129
19. Piez, K.A., Miller, E.J., Lane, J.M.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 (1969), 801
20. Vuust, J., Lane, J.M., Fietzek, P.P., Miller, E.J., Piez, K.A.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 (1970), 703
21. Rauterberg, J., Kühn, K.  
FEBS Letters 1 (1968), 230
22. Rauterberg, J. Timpl, R., Furthmayr, H.  
Eur. J. Biochem. 27 (1972), 231
23. Fietzek, P.P., Wendt, P., Kell, J., Kühn, K.  
FEBS Letters 26 (1972), 74
24. Fietzek, P.P., Rexrodt, F.W., Hopper, K., Kühn, K.  
Eur. J. Biochem. 38 (1973), 396

25. Wendt, P., v.d.Mark, K., Rexrodt, F.W., Kühn, K.  
Eur. J. Biochem. 30 (1972), 169
26. Fietzek, P.P., Rexrodt, F.W., Wendt, P., Stark, M., Kühn, K.  
Eur. J. Biochem. 30 (1972) 163
27. Michael Stoltz Dissertation Uni München 1972
28. Kang, A.H., Bornstein, P., Piez, K.A.  
Biochem. 6 (1967), 788
29. Bornstein, P.  
Biochem. 6 (1967), 3082
30. Butler, W.T., Ponds, S.L.  
Biochem. 10 (1971), 2076
31. Butler, W.T.  
Biochem. 9 (1970), 44
32. Balian, G., Click, E.M., Hermodson, M.A. Bordstein, P.  
Biochem. 11 (1972), 3798
33. Fietzek, P.P., Münch, M., Breitkreutz, D., Kühn, K.  
FEBS Letters 9 (1970), 229
34. Fietzek, P.P., Piez, K.A.  
Biochem. 8 (1969), 2129
35. Stark, M., Kühn, K.  
Eur. J. Biochem. 6 (1968), 534
36. Reisfeld, R.A.  
Nature 195 (1962), 281
37. Rauterberg, J. Kühn, K.  
Eur. J. Biochem. 19 (1971), 398
38. Stark, M., Rauterberg, J., Kühn, K.  
FEBS Letters 13 (1971), 101

39. Furthmayr, H., Timpl, R.  
Anal. Biochem. 41 (1971), 510
40. Fietzek, P.P., Kühn, K.  
FEBS Letters 36 (1973), 289
41. Volpin, D., Veis, A.  
Biochem. 10 (1971), 1751
42. Kostka, V., Carpenter, F.H.  
J. Biol. Chem. 239 (1964), 1799
43. Edman, P., Begg, G.  
Eur. J. Biochem. 1 (1967), 80
44. Edman, P.  
in: Protein Sequence Determination (Needleman, S.B.)  
S.211, Springer 1970: Berlin-Heidelberg-New York
45. Pisano, J.J., Bronzert, T.J.  
J. Biol. Chem. 244 (1969), 5597

## Lebenslauf

von Evangelos Hadjiargyriou Moschoudis, griechischer Staatsangehöriger.

geb: 9.6.1941 in Alexandrien/Ägypten.

Vater: Dimitrios Hadjiargyriou, Arbeiter

Mutter: Sophia, geborene Moschoudis

Ausbildungsweg: Von 1947-1953 Volksschule in Alexandrien.

1953-1959 Besuch des humanistischen Gymnasiums für Jungen in Alexandrien. Abitur am 22. Juni 1959.

Von August bis September 1960 Besuch des Goethe-Instituts in Iserlohn/Westf. anschließend bis Mai 1961 bei der chemischen Firma E.Merck/Darmstadt beschäftigt.

Im Sommersemester 1961 Immatrikulation an der Universität Würzburg mit der Fachrichtung Chemie, im Wintersemester 1961/1962 Beginn des Studiums. Diplom-Vorprüfung im Dezember 1964.

Von Wintersemester 1966/1967 bis Wintersemester 1967/1968

Besuch der FU Berlin. Diplom-Hauptprüfung im Oktober 1970 an der Universität Hamburg. Seit November 1970 mit der Anfertigung einer Dissertation am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung unter Leitung von Prof. Dr. K. Kühn beschäftigt.

Ich bin verheiratet und habe einen Sohn.





